

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular



ESTUDIO DE LA **ACTIVIDAD** DE LAS **CÉLULAS MADRE NEURALES** **ADULTAS** EN EL MODELO DE **RATÓN SAMP8**

María Díaz Moreno
Licenciada en Ciencias Biológicas

Directora: Doctora Helena Mira Aparicio
Tutora: Doctora Jorgina Satrustegui



Memoria presentada por **MARÍA DÍAZ MORENO** para optar al grado de DOCTORA POR LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID en el PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOCIENCIAS MOLECULARES.

Helena Mira Aparicio, Doctora en Biología y científica titular del ISCIII,

AUTORIZA la presentación de la Tesis Doctoral titulada “**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LAS CÉLULAS MADRE NEURALES ADULTAS EN EL MODELO DE RATÓN SAMP8**”, de la que es autora María Díaz Moreno, licenciada en Ciencias Biológicas, y que ha sido realizada bajo mi dirección en el Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Majadahonda, el día 9 de Febrero de 2015.

Fdo. Helena Mira Aparicio
Instituto de Salud Carlos III
Majadahonda (Madrid)

*A mis padres
y a Pablo*

AGRADECIMIENTOS

En estas líneas, para mi quizás las más importantes de esta tesis, quiero agradecer a todos los que de un modo u otro me habéis acompañado y habéis hecho posible que esté cerca de cumplir un sueño.

A mi directora Helena, quiero agradecerte tu fuerza y tu esfuerzo, que me hayas transmitido tu pasión por investigar y que me hayas enseñado lo que es hacer ciencia buena y de verdad. Eres una gran investigadora pero sobre todo eres una persona increíble, gracias por tus palabras de cariño, por tus abrazos en los peores momentos y por protegerme siempre. A mi laboratorio, porque sois una pequeña familia y, como tal, os habéis quedado con un pedacito de mi corazón. Rafa, gracias por todas y cada una de las innumerables cosas que has hecho por mi, gracias por cuidarme y saber, a veces antes que yo, lo que necesitaba. Gracias por acertar siempre con tu sinceridad, con tus palabras de ánimo y con tus bromas, ¡Gracias por haber formado conmigo el mejor equipo y por hacer que no pueda decirte adiós! Pilarinchi, gracias por haberme hecho crecer como científica y, sobre todo, como persona. Gracias por tu sinceridad, por tus consejos, por las largas tardes de apoyo y por quererme, sobre todo, cuando soy un poco troll porque eso es lo que te hace tan especial. Mireia, gracias abuela cebolleta por contestar mis innumerables preguntas, por hacer que admire tu forma de ser y por acogerme con tanto cariño. Zo, gracias por hacer que mi llegada al laboratorio sea uno recuerdo muy dulce, por tu amistad y por tu apoyo. Gracias por tu maravillosa familia y por los ratos de montaña compartidos. Ânia, gracias por tu fuerza y tu amistad, porque siempre que nos despedimos me quedo llorando y eso quiere decir algo, quizás que nunca me olvidaré de ti, amiga. Nilson, gracias por un año inolvidable, por tu solidaridad y por ser tan buena persona. Nieves, mi alemana preferida, gracias por compartir preocupaciones y por seguir a mi lado a pesar de la distancia. Edurne, gracias por tu fuerza, tu coraje y tus ganas de vivir, gracias porque además sabes cómo contagiarlas. Tomás, gracias por confiar en mi para las cosas que más te importan, eso se guarda en un sitio especial del corazón. Juany, gracias también por confiar en mi y por ser valiente dándote una nueva oportunidad de sonreír. Gracias a Santi, por sacarme siempre una sonrisa y por tu gran corazón, a Sigrid por tu fuerza y por demostrar que cuando no hay motivos para sonreír, tu te ríes de la vida a carcajadas. Gracias a Andrea por convertirme en un gran apoyo dentro y fuera del laboratorio y por tu sonrisa incondicional. Gracias a Laura Urrutia, Mercedes, Laura Remacha, Lucía, Diana y María porque sois grandes compañeras y, sobre todo, grandes personas.

A los compañeros de pasillo. Titina, no tengo palabras para agradecerte tu amistad, eres simplemente increíble y eso hace que me sea imposible decirte adiós y me cueste infinito rojo decirte hasta pronto. Gracias por ser la mejor compi de tesis que he podido tener y que podría haber deseado. Nati, gracias por darnos un ejemplo de lucha constante y por sacar una sonrisa a los que lo necesitábamos menos

que tú, creo que eres irrepetible y digna de admiración. A Pilar peque, gracias por tu dulzura y por ser tan buena, persona y actriz! ChiquiRebe! Gracias por los gyny, por las charlas, por los consejos y por los mensajes de apoyo desde miles de kilómetros de distancia, Invernalía Rules!! Vane y Cris, mis parguelas, gracias simplemente por todo, en especial por quererme tanto como lo hacéis. Gracias por ser siempre grandes amigas. Vero y Malu, gracias por ser tan buena gente y por luchar tanto para conseguir vuestros objetivos. Marçal, gracias por tu cercanía y por creer en mí cuando ni yo misma lo tengo claro. Pili, gracias por ser “jefa en funciones” siempre que te hemos necesitado. Fernando y Silvia, gracias por haberos convertido en mucho más que un servicio, gracias por dedicarme tantos ratos hablando de todo y por fomentar, aún más, mi pasión por la fotografía, sois increíbles. Dani, gracias por tu espontaneidad, tu sentido del humor y por estar siempre dispuesto a ayudarme aunque al final siempre me acabes vacilando. Raquel, gracias por toda tu ayuda, lo que haces es impagable. Pilar Gómez, gracias por darme mi primera oportunidad en ciencia, eso no se puede olvidar.

Gracias a Manu, mi rubita, gracias porque por desgracia tu destino inspira estas líneas pero también ha inspirado las grandes decisiones de mi vida. Al final lo he conseguido porque tu recuerdo siempre me ha empujado hacia delante, te echo de menos y nunca te olvidaré. A los de siempre, Luna y Fer, incondicionales en las risas y en las lágrimas, pero siempre cuando más se les necesita, os quiero. A Camila y a Juan, por convertirse en imprescindibles en mi vida, por sus locuras y porque hacen desaparecer los problemas. A los chinos, Vic y Marta, por aparecer en mi vida y un año después cambiarla para siempre. A Paula, Ester, Cris y Liye por vuestro apoyo constante desde hace tantos y tantos años. A Vero, porque ha llovido desde los 7 años, pero aquí sigues, siempre entre las líneas más importantes de mi vida. A Isa, por todo tu cariño y apoyo. A Fer y Vero, por vuestra amistad y apoyo desde hace tantos años, os quiero mucho. María Antonia, José y Raquel, gracias por contar siempre conmigo, acogerme con tanto cariño y dejarme ser una más en mi familia valenciana.

Finalmente quiero agradecer de una manera muy especial a mi hermano, gracias por las risas absurdas, por los gritos desde las terrazas, por los 21 días de boda y por, junto a Raquel, apoyarme incluso cuando practico charlas con vosotros y no sabéis de que van, pero allí estáis, tomando notas. Si hubiera podido elegir hermano, no habría podido elegirlo mejor. A mis niñas, Andrea y Ainhoa, por llenar de felicidad cada rincón que pisan, en especial a Andrea, porque cada vez que hacemos “equipo” me hace un poco más feliz. A mis padres, por vuestro apoyo infinito aun cuando no sabíais donde me llevaban mis decisiones. Gracias por haberme enseñado que caerme sólo me hacía más fuerte. Gracias mamá por tus charlas de apoyo y comprensión hasta altas horas de la madrugada. Gracias papá por enseñarme a luchar por mis sueños y no dejar que nada me frene. Ojalá algún día alguien escriba sobre mí con la mitad de cariño y admiración que escribo yo hoy sobre vosotros. Siento mucho orgullo de parecerme a vosotros. Gracias a Pablo, porque sin él hoy esta tesis simplemente no existiría, gracias por soñar a mi lado y por darme alas para vivir. Gracias por enseñarme qué es el amor. Gracias por ser mi compañero de vida.

RESUMEN

En mamíferos adultos, las células madre neurales multipotentes (NSCs) se han propuesto como el origen de la neurogenesis en regiones concretas del cerebro, como la zona subventricular (SVZ) de los ventrículos laterales y la zona subgranular (SGZ) del giro dentado (DG) del hipocampo. A pesar de su función clave en procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria, la neurogénesis adulta en ambas regiones decae drásticamente con la edad, sin embargo, la causa subyacente de esta reducción neurogénica se desconoce. Algunos autores sugieren una degeneración/alteración de la señalización del nicho mientras otros apuntan a una capacidad limitada de las NSCs para dividirse. Además, la edad es el mayor factor de riesgo en la Enfermedad de Alzheimer (EA), aunque en los modelos murinos de EA aún existen discrepancias entorno a la afectación de la neurogénesis. Algunos autores apuntan a la reducción de este proceso mientras otros muestran un incremento. Tanto los mecanismos celulares intrínsecos como extrínsecos pueden inducir, no sólo el descenso neurogénico durante el envejecimiento, si no también las alteraciones neurogénicas observadas durante la progresión de la EA. En este estudio, analizamos la actividad de las NSCs adultas de la cepa de ratón SAMP8 (Senescence-Accelerated Mouse Prone 8), que es un modelo de envejecimiento acelerado que desarrolla patologías características de la EA, y su cepa control SAMR1 (Senescence-Accelerated Mouse Resistant 1). Los estudios longitudinales llevados a cabo *in vivo* en la SVZ y en la SGZ, mostraron una disminución en la proliferación durante el envejecimiento de ambas cepas. Sin embargo, en la SVZ, los animales SAMP8 de 2 meses mostraron un mayor número de células NSCs en división (BrdU⁺) en comparación con los animales SAMR1. Este incremento transitorio en la actividad de las NSCs, dio lugar a un aumento en el número de neuroblastos que llegaron al Bulbo Olfatorio (OB). Los estudios *in vitro*, empleando cultivos de neuroesferas procedentes de la SVZ de ambas cepas, corroboraron dichas observaciones y apuntaron al péptido Amiloide Beta 1-42 (A β 1-42) como una molécula de secreción. A β 1-42 no solo aumenta la capacidad clonogénica de las NSCs, si no que también incrementa la proliferación celular a través de la vía de señalización PI3K/Akt. En la SGZ, los animales SAMP8 mostraron un número reducido de NSCs, aunque estas eran proliferativamente más activas que las de los SAMR1. Estas NSCs de los animales SAMP8 generaron un mayor número de astrocitos y un reducido número de neuronas maduras, tres semanas después de la inyección con BrdU, en comparación con los SAMR1. Ensayos de western blot, mostraron un incremento de BMP6 en el DG de animales SAMP8 jóvenes. Además, BMP6 purificado resultó gliogénico en ensayos *in vitro* sobre NSCs hipocámpales adultas. La inhibición *in vivo* de la vía de señalización de BMP, mediante la infusión intracerebral del antagonista Noggin, aumentó la población de NSCs y su proliferación en SAMP8. Noggin también redujo el número de astrocitos e incrementó el número de neuronas maduras en animales SAMP8 de 2 meses. Todos estos datos apuntan a una alteración temprana de la señalización en la SVZ y la SGZ que modifica la actividad de las NSCs, antes de la aparición de los primeros síntomas de la EA en animales SAMP8, y que podría ser la causa subyacente de los déficits cognitivos de este modelo animal.

SUMMARY

In adult mammals, multipotent Neural Stem Cells (NSCs) have been proposed to be the source of adult neurogenesis in discrete brain regions, such as the subventricular zone (SVZ) of the lateral ventricles and the subgranular zone (SGZ) of the dentate gyrus (DG) in the hippocampus. In spite of its key role, in cognitive processes such as learning and memory, adult neurogenesis within these areas declines dramatically with increasing age and the cause that underlies this neurogenic reduction remains unclear. Some authors suggest a marked effect of the degeneration/alteration of niche signalling while others point to a limited ability of the NSCs to divide. Besides, age is the major risk factor for Alzheimer's Disease (AD), yet in AD mouse models there is still discrepancy regarding the impact on adult neurogenesis. Some authors point to a reduction of this process while some others point to an increase. Both intrinsic and extrinsic cellular mechanisms could work in concert and account not only for the neurogenic decline during ageing but also for the neurogenic alterations observed during AD progression.

In this study, we analyse the activity of adult NSCs from the Senescence-Accelerated Mouse Prone (SAMP8) strain, which is a complex model of accelerated ageing that develops age-related neuropathological hallmarks of AD, and its control strain, Senescence-Accelerated Mouse Resistant (SAMR1). As expected, longitudinal *in vivo* analysis of the SVZ and SGZ showed a decrease in proliferation as specimens of both strains, SAMR1 and SAMP8, get old. In the SVZ, however, SAMP8 animals showed a higher number of BrdU⁺ active dividing NSCs at 2 months old in comparison to SAMR1. This transient raise in NSC activity led to an increase in the number of neuroblasts that reached the Olfactory Bulb (OB). *In vitro* analysis using neurosphere cultures from the SVZ of both strains were in agreement with the *in vivo* observations and pointed to Amyloid β (A β 1-42) as a secreted molecule. A β 1-42, not only enhanced the clonogenic capacity of NSCs, but also increased cell proliferation through the PI3K/AKT signalling pathway. In the SGZ, SAMP8 animals showed a reduced number of NSCs although they were more active than in SAMR1. These NSCs from SAMP8 generated an increased number of astrocytes and a reduced number of mature neurons 3 weeks after BrdU labelling in comparison to SAMR1. Protein analysis by western blot, showed an increased amount of BMP6 in the DG of young SAMP8. Moreover, purified BMP6 was gliogenic when assayed on adult hippocampal NSCs *in vitro*. The *in vivo* inhibition of the BMP pathway through intracerebral infusion of the antagonist Noggin increased the population of NSCs and their proliferation in SAMP8. Noggin also reduced the number of generated astrocytes and increased the number of mature neurons in 2 months old SAMP8. All these data point to an early alteration of SVZ and SGZ niche signalling components that modify the activity of the NSCs previous to the appearance of the first AD hallmarks in SAMP8 and that partly can underlie some of the cognitive deficits of this mouse model.

ÍNDICE

CLAVE DE ABREVIATURAS	17
-----------------------	----

INTRODUCCIÓN	21
--------------	----

1. Historia de la neurogénesis en el cerebro adulto de los mamíferos	21
2. Regiones neurogénicas en el cerebro adulto de los mamíferos	22
2.1. Neurogénesis en la Zona Subventricular (SVZ)	22
2.2. Neurogénesis en la Zona Subgranular (SGZ)	26
3. El nicho neurogénico como unidad funcional	27
4. Relevancia funcional de la neurogénesis adulta	28
5. La Enfermedad de Alzheimer	31
5.1. Moléculas implicadas en la EA que, a su vez, regulan la neurogénesis	32
5.1.1. A β 1-42	32
¿Cómo se produce el A β 1-42?	32
¿Qué implicación tiene el A β 1-42 en la neurogénesis?	34
5.1.2. Proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs)	34
¿Cómo señalizan las BMPs?	34
¿Qué implicación tienen las BMPs en la neurogénesis y en la EA?	35
5.2. Aspectos genéticos de la EA	37
5.3. Modelos murinos de la EA familiar	38
5.4. SAMP8 como posible modelos murino de la EA esporádica	39
6. Efecto de la EA sobre la neurogénesis: ¿es un regulador positivo ó negativo?	40

OBJETIVOS	45
-----------	----

MATERIALES Y MÉTODOS	49
----------------------	----

1. Animales	49
2. Métodos <i>in vivo</i>	49
2.1. Inyección de análogos de timidina	49
2.1.1. Estudio de la actividad proliferativa en la SVZ e HC de SAMR1 y SAMP8	50
2.1.2. Estudio de la dinámica celular en el HC (Ensayos de Pulso-caza)	50

2.2. Infusión de Noggin a través de mini-bombas osmóticas	50
2.2.1. Montaje de las bombas	50
2.2.2. Implantación de las bombas	51
2.3. Técnicas histológicas	52
2.3.1. Fijación	52
2.3.2. Postfijación	53
2.3.3. Procesamiento del tejido	53
2.3.4. Inmunohistoquímica	54
2.3.5. Reacción histoquímica de la β -galactosidasa asociada a la senescencia	55
2.3.6. Tinción de Hematoxilina y Eosina	55
2.3.7. Análisis inmunohistoquímico	56
A. Obtención de Imágenes	56
B. Estereología	56
3. Métodos <i>in vitro</i>	57
3.1. Extracción de tejido de la SVZ, CA1 y DG	57
3.2. Cultivo de NSCs de la SVZ adulta	58
3.2.1. Aislamiento de SVZ-NSCs de ratón	58
3.2.2. Subcultivo: expansión y mantenimiento de los cultivos	59
3.2.3. Criopreservación y descongelación de cultivos de NSCs	59
3.2.4. Caracterización de los cultivos de NSCs	60
3.2.4.1. Determinación de la capacidad de auto-renovación de un cultivo mediante ensayos de formación de esferas	60
3.2.4.2 Determinación de la capacidad de proliferación de un cultivo de NSCs	60
3.2.5. Ensayos de proliferación y autorrenovación con medios condicionados	61
3.2.6. Ensayos de proliferación y autorrenovación en presencia de anticuerpos contra el péptido Beta Amiloide 1-42 ((A β (1-42))	61
3.2.7. Ensayos de proliferación y autorrenovación de neuroesferas en presencia de A β (1-42).	61
3.2.8. Ensayos de la vía de señalización A β (1-42): bloqueo de PI3K, MEK y detección de P-AKT.	61
3.2.9. Técnicas inmunocitoquímicas	62
3.2.10. Análisis Inmunocitoquímico	62
3.3. Ensayos con células HC7	63

3.3.1. Mantenimiento de la línea HC7	63
3.3.2. Ensayos de diferenciación de células HC7	63
4. Inmunodetección de proteínas y péptidos	63
4.1. Preparación de los péptidos sintéticos A β (1-42) y A β (42-1)	63
4.2. Extracción de la proteína total	64
4.3. Cuantificación de la proteína total	64
4.4. Preparación de las muestras para Western Blot	65
4.5. Preparación de geles. Electroforesis. Transferencia a membrana	65
4.5.1. Preparación de geles SDS-PAGE	65
4.5.2. Preparación de geles SDS-PAGE de alta resolución	65
4.6. Incubación de las membranas con los anticuerpos	66
4.7. Ensayo de inmunoabsorbancia asociado a reacción enzimática (ELISA)	66
5. Estudios de expresión génica	67
5.1. Extracción de RNA total	67
5.2. RT y Q-PCR	67
6. Análisis estadístico	68
Tabla resumen de anticuerpos primarios	69
Tabla resumen de anticuerpos secundarios	70
Tabla resumen de cebadores	71

RESULTADOS 73

CAPÍTULO 1

Caracterización anatomopatológica de la cepa de ratón SAMP8 frente a su cepa control SAMR1	75
--	----

1.1. Análisis macroscópico y anatomopatológico: La cepa P8 presenta características de senescencia acelerada a partir de los 6 meses de edad	75
1.2. Análisis de la patología cerebral asociada a la EA: La cepa P8 muestra la aparición de los primeros síntomas a los 6 meses de edad	77

CAPÍTULO 2

Caracterización de la actividad de las Células Madre Neuronales en la Zona Subventricular de la cepa de ratón SAMP8 y SAMR1	81
---	----

2.1. La proliferación en la SVZ de los animales P8 se incrementa de forma transitoria a los 2 meses de edad y decae a los 14 meses	81
--	----

2.2. El incremento de proliferación en la SVZ de los animales P8 de 2 meses correlaciona con un aumento en el número de nuevas neuronas en el OB	83
2.3. El incremento en la proliferación de la SVZ de los P8 a edades tempranas correlaciona con un aumento de la actividad de las NSCs (células Tipo-B)	84
2.4. Los cultivos de NSCs de animales P8 jóvenes muestran una mayor proliferación que los de R1 de la misma edad	86
2.5. Análisis de los mecanismos autónomos implicados en el aumento de la proliferación y la formación de esferas en los cultivos de NSCs de animales P8 jóvenes	89
2.5.1. Las neuroesferas P8 secretan factores solubles que incrementan la actividad de las NSCs	89
2.5.2. El péptido A β como posible factor secretado por las NSCs de los P8 jóvenes	90
2.5.3. Los animales P8 de 2 meses presentan <i>in vivo</i> niveles ligeramente más altos de A β (1-42) en la SVZ	91
2.5.4. El péptido A β (1-42) aumenta la actividad de las NSCs de animales R1	92
2.6. La inhibición de la vía de señalización PI3K/AKT en las NSCs de la SVZ bloquea la actividad de A β (1-42)	94

CAPÍTULO 3

Caracterización de la actividad de las Células Madre Neurales en el Giro Dentado del Hipocampo de las cepas de ratón SAMP8 y SAMR1 97

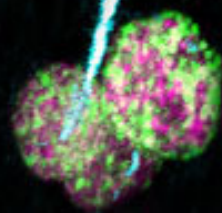
3.1. La actividad proliferativa en la SGZ de animales P8 y R1 disminuye durante el envejecimiento	97
3.2. Los animales P8 de 2 meses presentan un menor número de NSCs radiales y células SOX2 ⁺ no radiales en la SGZ, pero ambas poblaciones son proliferativamente más activas que en la cepa control.	98
3.3. Estudio de la senescencia y la apoptosis como posibles factores causantes de la pérdida de NSCs en la SGZ de los animales P8 de 2 meses	102
3.4. Los animales P8 de 2 meses muestran un elevado número de neuroblastos y de neuronas inmaduras en la SGZ	103
3.5. Análisis de la dinámica y destino celular en la SGZ de los animales P8 de 2 meses frente a las cepas control R1 y C57BL6	104
3.5.1. Estudio de la dinámica celular de la cepa control C57BL6	104
3.5.2. Estudio de la dinámica celular de las cepas R1 y P8	106

3.6. Caracterización de las moléculas de señalización que regulan la actividad de las NSCs y su progenie en la SGZ de los animales P8 de 2 meses	108
3.6.1. Los animales P8 de 2 meses presentan un incremento en la SGZ de la expresión de genes relacionados con la activación de la vía de BMPs	108
3.6.2. Los animales P8 de 2 meses presentan niveles elevados de proteína BMP6 madura en el DG	110
3.6.3. BMP6 induce la gliogénesis en cultivos de células madre hipocampales adultas	110
3.7. Inhibición <i>in vivo</i> de la vía de BMPs en el DG mediante la infusión de Noggin en los animales P8 de 2 meses	111
3.7.1. La inhibición de la vía de BMPs incrementa el número de NSCs radiales así como su proliferación en animales P8 de 2 meses	111
3.7.2. La inhibición de la vía de BMPs reduce el número de neuroblastos y neuronas inmaduras en animales P8 de 2 meses	114
3.8. Análisis de la dinámica y destino celular en la SGZ de los animales P8 de 2 meses tratados con Noggin	115
DISCUSIÓN	121
1. Los animales P8 presentan, además de síntomas de envejecimiento prematuro, características similares a la EA a partir de los 6 meses de edad	121
2. Caracterización de la actividad de las NSCs en la SVZ de los animales P8	123
2.1. Los animales P8 de 2 meses muestran un aumento en el número de células BrdU ⁺ debido a la hiperproliferación transitoria de las NSCs	123
2.2. Análisis del comportamiento bifásico de las NSCs durante el envejecimiento de los animales P8	124
2.3. El péptido A β 1-42 induce la proliferación de las NSCs de la SVZ en cultivo	126
3. Caracterización de la actividad de las NSCs en la SGZ de los animales P8	128
3.1. Las poblaciones SOX2 ⁺ radiales y no radiales de los P8 se pierden a edades tempranas y las neuronas de nueva formación no maduran	128
3.2. Las NSCs radiales de los P8 jóvenes se diferencian a astrocitos maduros	130
3.3. BMP6 se sobreexpresa en los animales P8 jóvenes y presenta propiedades gliogénicas	130
3.4. La infusión <i>in vivo</i> de Noggin rescata el número de NSCs radiales de los animales P8 y reduce el número de neuroblastos y neuronas inmaduras	132
3.5. La infusión <i>in vivo</i> de Noggin reduce el número de nuevos astrocitos e incrementa el número de nuevas neuronas maduras	133

CONCLUSIONES	139
BIBLIOGRAFÍA	145
ANEXO	169

CLAVE DE ABREVIATURAS

Aβ (1-42) , Amyloid Beta 1-42	NMDA , N-Metil-D-Aspartate
AICD , APP Intracelular Domain	NSC , Neural Stem Cell
APP , Amyloid Precursor Protein	NT3 , Neurotrophin 3
ASCL1 , Achaete_Scute homolog 1	OB , Olfactory Bulb
BACE , Beta-site APP-Cleaving Enzyme	PS1 , Presenilin 1
BMP , Bone Morphogenetic Protein	PSA-NCAM , Polysialylated-Neural Cell Adhesion Molecule
BMPR1A , Bone Morphogenetic Protein Receptor 1A	Pyr , Piramidal Layer
BMPR1B , Bone Morphogenetic Protein Receptor 1B	qRT-PCR , quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction
BMPR2 , Bone Morphogenetic Protein Receptor 2	Rad , Estratum Radiatum
BrdU , Bromo Deoxiuridin	RMS , Rostral Migratory Stream
CA1 , Cornu Ammonis 1	RNA , Ribonucleic Acid
CA3 , Cornu Ammonis 3	ROS , Reactive Oxygen Species
CSF , Cerebrospinal Fluid	SA-β-Gal , Senescence associated Beta-galatosidase
DCX , Doublecortin	SAMP8 , Senescence-Accelerate Mouse Prone
DG , Dentate Gyrus	SAMR1 , Senescence-Accelerate Mouse Resistant
DNA , Deoxyribonucleic Acid	SGZ , Subgranular Zone
EA , Enfermedad de Alzheimer	Shh , Sonic Hedgehog
EGFR , Epidermal Growth Factor Receptor	SOX2 , Sex determining region Y-bOX2
FGF2 , Fibroblast Growth Factor 2	Spt , Septum
GABA , Gamma-Aminobutiric Acid	St , Striatum
GCL , Granule Cell Layer	SVZ , SubVentricular Zone
GFAP , Glial Fibrillary Acidic Protein	TAP , Transient Amplifying Progenitors
GLAST , Glutamate Aspartate Transporter	Tbr2 , T-box Brain protein 2
H , Hilus	Tg , TransGenic
HC , Hippocampus	TGF-β , Transforming Growth Factor Beta
LRC , Label Retaining Cell	WB , Western Blot
mRNA , Messenger RiboNucleic Acid	Wnt , Wingless-type MMTV integration type site
Ng2 , Nerve/glial antigen 2	
NGF , Nerve Growth Factor	
Ngn2 , Neurogenin 2	



“En algún sitio algo increíble espera ser descubierto”

Carl Sagan

introducción

INTRODUCCIÓN

1. Historia de la neurogénesis en el cerebro adulto de los mamíferos

La neurogénesis adulta es el proceso de formación de nuevas neuronas a partir de células madre neurales (NSC, del inglés Neural Stem Cell) a lo largo de la vida adulta del individuo, una vez finalizado su desarrollo. Este proceso, que resulta evidente en nuestros días, fue discutido hasta hace apenas 50 años. A principios del siglo XX, Santiago Ramón y Cajal mostraba por primera vez que el tejido cerebral estaba compuesto por células nerviosas individuales, descubrimiento por el que recibió el premio Nobel de medicina en el año 1906, pero también concluía en su estudio que las neuronas se generaban de forma exclusiva durante la etapa prenatal del desarrollo (revisado por Colucci-D'Amato et al., 2006). Esta visión estática de las células neurales fue aceptada hasta que, en 1912, Erza Allen observó por primera vez células en mitosis en las paredes del ventrículo lateral del cerebro adulto de roedores (Allen, 1912). No sería hasta 46 años después cuando se publicó el marcaje de células en división en el cerebro de los roedores mediante el empleo de timidina tritiada, que se incorpora durante la síntesis del DNA (Meisser et al., 1958). Sin embargo, la neurogénesis como tal se describió por primera vez por Joseph Altman en la década de los 60 (Altman, 1962; Altman, 1969; Altman y Das 1965). Tras 30 años, la neurogénesis volvió a ser un tema científico en auge gracias a varios factores. Por un lado a la publicación de varios estudios que caracterizaban en detalle las zonas neurogénicas propuestas hasta el momento (Lois y Alvarez-Buylla, 1994; Cameron et al., 1993), por otro lado al descubrimiento en 1992 de la presencia de NSCs en mamíferos adultos que además podían aislarse y cultivarse *in vitro* (Reynolds y Weiss, 1992) así como al trabajo de Peter Eriksson y colaboradores en 1998 que defendía la neurogénesis en humanos (Eriksson et al. 1998).

El resurgimiento de la neurogénesis como tema candente se debió en gran medida al avance de las técnicas metodológicas que permiten su estudio basadas, entre otras, en: (1) el marcaje con timidina tritiada combinada con técnicas inmunohistoquímicas, así como con diferentes técnicas de microscopía electrónica que demuestran el carácter neuronal de las células de nueva formación (Cameron et al.,

1993; Kaplan y Hinds 1977), (2) el uso de análogos de timidina como sustituto del marcaje radiactivo (Kuhn et al., 1996) o (3) el marcaje mediante el uso de retrovirus de las nuevas neuronas que permite seguir su maduración e integración (Van Praag et al. 2002).

2. Regiones neurogénicas en el cerebro adulto de los mamíferos

Hasta el momento, tan sólo se ha demostrado la existencia de dos regiones neurogénicamente activas en el cerebro adulto de los mamíferos en las que residen las NSCs: la zona subventricular (SVZ del inglés Subventricular Zone), localizada en las capas celulares adyacentes al epéndimo que reviste las paredes de los ventrículos laterales (revisado por Alvarez-Buylla y García-Verdugo, 2002) (Figura I1 A) y la zona subgranular (SGZ, del inglés Subgranular Zone), situada en el giro dentado del hipocampo (revisado por Kempermann y Gage, 2000) (Figura I1 B). Durante los últimos 15 años, algunos investigadores han propuesto nuevas regiones neurogénicas en el cerebro adulto que aún hoy se encuentran bajo intenso debate. Este es el caso del bulbo olfatorio (OB, del inglés Olfactory Bulb) donde, además de recibir e incorporar las nuevas neuronas procedentes de la SVZ, se podrían estar generando localmente nuevas neuronas (Gritti et al., 2002; Moreno-Estellés et al., 2012). También se apunta a regiones como la corteza piriforme, el tubérculo olfatorio, la amígdala, el hipotálamo y el núcleo vago entre otros (Bonfanti y Peretto, 2011). Otros autores apuntan a la zona subcallosa (SCZ, del inglés Subcallosal Zone) como fuente de neuroblastos y oligodendrocitos en la edad adulta (Seri et al., 2006) así como a la corteza cerebral (Gould et al., 1999) o la sustancia negra (Zhao et al., 2003), aunque estas dos últimas regiones también han presentado detractores durante los últimos años (Kay y Blum, 2000; Kornack y Rakic, 2001). Muy recientemente, Ernst y colaboradores han descrito la neurogénesis estriatal en humanos a través de la detección de células neuronales marcadas con ^{14}C (Ernst et al., 2014).

2.1 Neurogénesis en la Zona Subventricular (SVZ)

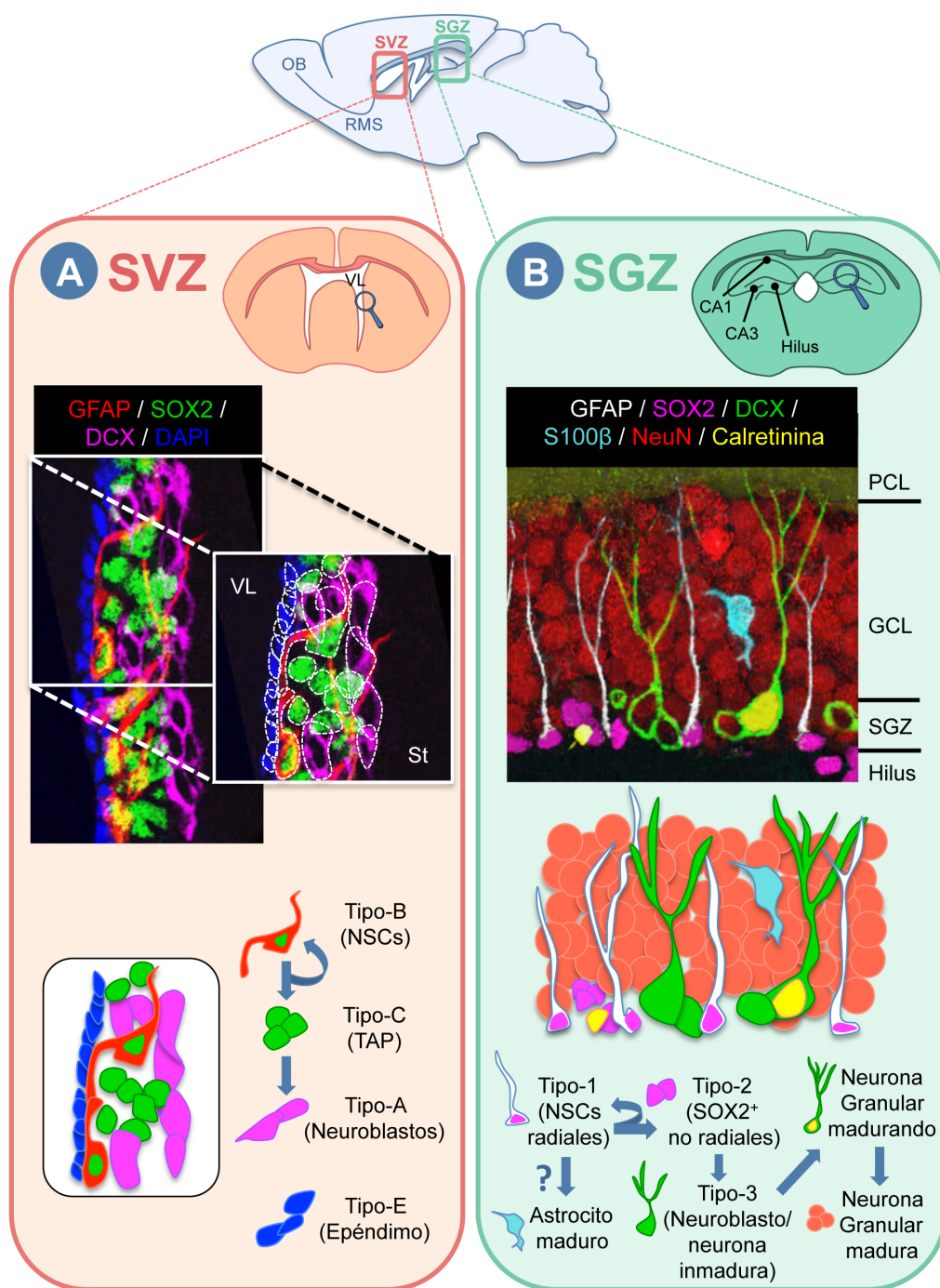
En esta región las NSCs o células tipo-B, cuyas principales características frente a otros tipos celulares son su capacidad de autorrenovación y multipotencialidad, se dividen dando lugar a los progenitores de rápida amplificación o células Tipo-C (TAP, del inglés Transient Amplifying Progenitor). Estas células descendientes son capaces de dividirse un mayor número de veces que las NSCs dando lugar a los neuroblastos, cuyo destino celular está determinado hacia el linaje neuronal. Estos neuroblastos migran tangencialmente formando una cadena a lo largo del camino migratorio rostral (RMS, del inglés Rostral Migratory Stream) envueltos por astrocitos ensamblados en forma tubular (revisado por Alvarez-Buylla y García-Verdugo, 2002) (Figura I1). Una vez alcanzan el núcleo del OB, estas neuronas inmaduras abandonan el RMS y migran radialmente hasta la capa granular y periglomerular donde se diferencian principalmente a diversos subtipos de interneuronas inhibitorias que se integran en la estructura del OB

(revisado por Lledo et al., 2008). De forma más detallada, la citoarquitectura de la SVZ comprende los siguientes subtipos celulares:

Células Tipo-B: Citoplasma rojo, núcleo verde en la Figura I1 A. Son las NSCs de la SVZ. Presentan una morfología que les permite contactar de forma simultánea tanto con la luz del ventrículo, y por tanto con el líquido cefalorraquídeo (CSF, del inglés Cerebro Spinal Fluid) mediante su proceso apical, como con los vasos sanguíneos, a través de su proceso basal que termina en una estructura de pie vascular (revisado por Ihrie y Alvarez-Buylla, 2011). Algunos autores subdividen esta población en Tipo-B1, si se encuentran estrechamente asociadas a las células endimales, y Tipo-B2 si se encuentran situadas en el parénquima estriatal subyacente. En cualquier caso, las células tipo-B son mayoritariamente quiescentes aunque son capaces de entrar en ciclo y proliferar, representando un 12 % del total de células proliferantes en la SVZ (Doetsch et al., 1997). El ciclo de división de esta población se estima entre 17-18 horas con una fase S de unas 4 horas (Ponti et al., 2013). A pesar de su ciclo celular relativamente corto, y dado su principal estado de quiescencia, son capaces de incorporar y retener análogos de timidina en su DNA a largo plazo, por lo que también reciben el nombre de LRCs (del inglés Label Retaining Cells) (Morshead et al., 1994; Doetsch et al., 1997). Puesto que se trata de células de naturaleza astrocitaria, las células Tipo-B expresan la proteína fibrilar ácida de la glía GFAP (del inglés, Glial Fibrillary Acidic Protein), el factor de transcripción SOX2 (del inglés, Sex determining Region Y-box2) el transportador de glutamato GLAST (del inglés, Glutamate Aspartate Transporter) característico de células de la glía radial, el filamento intermedio de células indiferenciadas NESTINA (Suh et al., 2007; Kawaguchi et al., 2001; Mori et al., 2006; revisado por Kriegstein y Alvarez-Buylla 2009) así como el receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR, del inglés Epidermal Growth Factor Receptor) cuando se encuentran en su estado activo (Pastrana et al., 2009). Una vez en ciclo, presentan marcadores de división característicos como Ki67 (revisado por Scholzen y Gerdes, 2000) independientemente de si su división es simétrica, para autorrenovarse, o asimétrica, para dar lugar a las células Tipo-C ó TAP.

Células Tipo-C: Células verdes en la Figura I1 A. También denominadas progenitores de rápida amplificación o TAPs. Se encuentran situados junto a las células Tipo-B, de las que son progeie, y preferentemente en las proximidades de los vasos sanguíneos. Estas células completan su ciclo celular en aproximadamente 18-25 horas con una fase S de entre 14-17 horas (Ponti et al., 2013). Sin embargo, su tasa de división es más alta que la de las células Tipo-B, representando así el 52 % de las células en división de la SVZ (Doetsch et al., 1997). El hecho de dividirse de forma frecuente hace que diluyan, de una forma relativamente rápida, los análogos de timidina en comparación con las células madre Tipo-B. En cuanto a la expresión de marcadores, estas células continúan siendo EGFR⁺ pero pierden la expresión de GFAP. Además comienzan a expresar marcadores relacionados con la adquisición de un destino celular concreto, bien sea este neuronal u oligodendroglial como por ejemplo Olig2 (del inglés,

Oligodendrocyte transcription factor), Dlx2 (Distal-less homeobox 2), Mash1 (también llamada ASCL1 del inglés Achaete-scute homolog 1), Ngn2 (Neurogenina2) y Tbr2 (del inglés, T-box Brain protein 2) (revisado por Hsieh 2012). La descendencia celular mayoritaria de estas células es la Tipo-A, cuyo destino celular está comprometido hacia el linaje neuronal.



Adicionalmente y aunque en menor medida que las células Tipo-A ó neuroblastos, los TAPs también generan oligodendrocitos reconocibles mediante marcadores como el Proteoglicano Condroitín Sulfato (NG2, del inglés, Nerve/glial antigen-2) (Hack et al., 2005; Menn et al., 2006; Komitova et al., 2009), que migran al cuerpo calloso.

Células Tipo-A: Células rosas en la Figura I1 A. Denominados neuroblastos o progenitores neuronales, se encuentran principalmente en el RMS migrando desde la SVZ al OB. Expresan marcadores de neurona inmadura como BIIITUBULINA, DOBLECORTINA (DCX, del inglés Doublecortin) y PSA-NCAM (del inglés PolySialylated-Neural Cell Adhesion Molecule). Pese a que estos neuroblastos presentan un mayor grado de diferenciación que los tipos celulares de los que derivan, mantienen la capacidad de proliferar mientras migran por el RMS formando cadenas (revisado por Ihrie y Alvarez-Buylla 2011). Tienen un ciclo celular de unas 18 horas con una fase S de aproximadamente 9 horas de duración (Ponti et al., 2013) y representan el 15 % de células en división de la SVZ (Doetsch et al., 1997). Finalmente, cuando alcanzan el OB, se diferencian terminalmente a interneuronas inhibitorias de tipo granular ó periglomerular.

Células Tipo-E: Células azules en la Figura I1 A. Hacen referencia a las células endimales que forman el epitelio que separa físicamente la SVZ de la cavidad de los ventrículos laterales. Inicialmente se las consideró como las NSCs de la SVZ (Johansson et al., 1999) para posteriormente descartar esta hipótesis dado que son quiescentes y no presentan propiedades de NSCs *in vitro* (Doetsch et al., 1999; Capela y Temple, 2002; Chiasson et al., 1999). Se caracterizan por la presencia de microvellosidades y frecuentes cilios en la superficie expuesta a la luz del ventrículo (revisado por Peters et al., 1991). En función del número de cilios que presentan se subdividen en multicialadas (Tipo E1) y biciliadas (Tipo E2). Recientemente se ha demostrado que estas células se organizan formando estructuras en roseta, cuyo

FIGURA I1: Citoarquitectura del nicho neurogénico de la SVZ y la SGZ. (A) Inmunofluorescencia de los principales marcadores expresados por los distintos tipos celulares del nicho y esquema simplificado donde se muestran los principales componentes celulares implicados en el proceso neurogénico. Las células madre (NSCs) de división lenta o tipo-B (GFAP⁺/SOX2⁺, citoplasma rojo y núcleo verde) dan lugar a los progenitores de rápida amplificación (TAP) o tipo-C (SOX2⁺, en verde) los cuales a su vez darán lugar a neuroblastos o células tipo-A (DCX⁺, en rosa) y a precursores oligodendrogiales (no se muestra). Además, se observa el epéndimo como parte fundamental del nicho de la SVZ (DAPI, en azul). **(B)** Inmunofluorescencia de los principales marcadores en el nicho del DG así como un esquema de la progresión neurogénica y astrocitaria de las NSCs en la SGZ. Las NSCs o tipo-1 (GFAP⁺/SOX2⁺, citoplasma blanco y núcleo rosa) con morfología radial, dan lugar a los TAP, tipo-2 o SOX2⁺ no radiales (SOX2⁺, en rosa) los cuales a su vez darán lugar a neuroblastos/neuronas inmaduras o tipo-3 (DCX⁺, en verde) y a astrocitos (S100β⁺, en azul). Las nuevas neuronas que sobreviven dan lugar a neuronas en distinto grado de maduración (DCX⁺/Calretinina⁺, neuronas en proceso de maduración en amarillo y verde y NeuN⁺, neuronas maduras en rojo). VL, ventrículo lateral; St, Striatum; CA1, cornu ammonis 1; CA3, cornu ammonis 3; PCL, capa piramidal (del inglés, Piramidal Cell Layer). GCL, capa granular (del inglés, Granule Cell Layer). SGZ, zona subgranular (del inglés, Subgranular Zone). SVZ, zona subventricular (del inglés, Subventricular Zone).

centro es el punto por el que las células Tipo-B o NSCs contactan mediante su proceso apical con la luz del ventrículo (Mirzadeh et al., 2008). Presentan inmunoreactividad para la isolectina IB4 y la proteína de unión a calcio S100 β , así como para el factor de transcripción SOX2 (revisado por Pevny y Nicolis, 2010).

2.2 Neurogénesis en la Zona Subgranular (SGZ)

De forma similar al proceso neurogénico que tiene lugar en la SVZ, la SGZ presenta NSCs que en este caso se denominan células Tipo-1 o NSCs radiales. Dichas células al dividirse dan lugar a las células de rápida amplificación denominadas Tipo-2 o progenitores no radiales, que representan el paso intermedio para la formación de neuroblastos (también denominados células Tipo-3). Estos neuroblastos dan paso a las neuronas inmaduras que este caso migran una distancia corta hacia el interior de la capa granular (GCL, del inglés *Granule Cell Layer*) para finalizar su maduración y dar lugar a las neuronas granulares maduras (Figura I1 B). Así, la citoarquitectura de la SGZ quedaría comprendida por los siguiente subtipos celulares:

Células Tipo-1: Citoplasma blanco, núcleo rosa en la Figura I1 B. Son las NSCs del DG del hipocampo. También se les denomina células de glía radial o progenitores radiales dada su morfología. Se caracterizan por un único proceso radial que se proyecta a través de la GCL. Igual que en el caso de la SVZ, estas células son mayoritariamente quiescentes aunque capaces de entrar en ciclo e incorporar y retener análogos de timidina durante un largo periodo de tiempo, por lo que también reciben el nombre de LRCs (revisado en Ming y Song 2005). Dado que nuevamente se trata de células de naturaleza astrocitaria, son inmunoreactivas a prácticamente los mismos marcadores caracterizados para las NSCs de la SVZ (Suh et al., 2007) a excepción de, por ejemplo, EGFR. Al igual que las NSCs de la SVZ, estas células parecen tener capacidad de autorrenovación mediante divisiones simétricas, aunque este tema aún presenta controversias (Encinas et al., 2011; Bonaguidi et al., 2011). Las NSCs también pueden dividirse de forma asimétrica para dar lugar a las células Tipo-2 o progenitores no radiales. Sin embargo, ya en el año 2004, Steiner y colaboradores apuntaban a la capacidad de las NSCs de generar astrocitos maduros siguiendo una vía alternativa a la neurogénica (Steiner et al., 2004). En este aspecto, en el año 2011 nuevamente Encinas y colaboradores apuntaron a la capacidad de las NSCs de llevar a cabo una serie de divisiones asimétricas después de las cuales se diferenciarían terminalmente a astrocitos (células azules en la Figura I1 B) (Encinas et al., 2011).

Células Tipo-2: Células rosas en la Figura I1 B. También denominadas TAP o progenitores no radiales, sus características tanto a nivel de actividad proliferativa como de inmunoreactividad son muy similares a las mostradas por la células Tipo-C de la SVZ (Suh et al., 2007). Son positivas para los marcadores Tbr2, Ngn2, SOX2 y, según avanza su nivel de diferenciación, adquieren marcadores como NeuroD1 (revisado

por Hsieh, 2012). Algunos autores clasifican a su vez esta población en 2a y 2b en base a la expresión diferencial del factor SOX2 y DCX / PSA-NCAM. Cuando la expresión del marcador SOX2 disminuye, comienza el aumento en la expresión de DCX, lo que indica el paso de las células 2a a 2b (revisado por Hsieh, 2012). La diferencia fundamental entre ambos tipos celulares es que las células Tipo-2b presentan una capacidad de división más restringida así como un mayor grado de diferenciación (Brown et al., 2003b; Couillard-Despres et al., 2005).

Células Tipo-3: Células verdes en la Figura I1 B. También denominadas neuroblastos, presentan las mismas características inmunoreactivas que las células Tipo-A de la SVZ. Sin embargo, en este caso prosiguen su programa de diferenciación hacia neurona inmadura en la propia SGZ. Son inmunoreactivas, entre otros marcadores, a DCX y β III TUBULINA.

Neuronas de nueva formación: Podrían subdividirse en neuronas granulares inmaduras (células verdes y amarillas en la Figura I1 B) y maduras (células rojas en la figura I1 B). Las primeras, de la misma manera que en el OB, presentan marcadores como DCX y β III TUBULINA. Según van madurando abandonan el ciclo celular y comienzan a expresar CALRETININA. A los pocos días, y ya más adelantadas en su proceso de maduración, comienzan a exhibir marcadores como CALBINDINA y NeuN. Además, extienden sus dendritas hacia la capa molecular (parte superior de la inmunofluorescencia de la Figura I1 B) mientras proyectan sus axones a través del Hilus hacia la región CA3 (parte inferior de la inmunofluorescencia de la Figura I1 B). De este modo contactan con las neuronas piramidales de dicha región y finalmente se integran en el circuito neuronal preexistente del DG (revisado por Aimone et al., 2014).

3. El nicho neurogénico como unidad funcional

Se denomina nicho neurogénico al microentorno especializado en el que se encuentran las NSCs, en este caso en el animal adulto, y que es capaz de mantener a dichas células en un estado indiferenciado así como de preservar su capacidad de autorrenovar y generar células descendientes, dando neuronas y células de la glía (Ninkovic y Gotz, 2007). Se trata de regiones con características estructurales y de señalización únicas, tanto, que en el año 2000 Shihabuddin y colaboradores probaron cómo células progenitoras derivadas de regiones no neurogénicas del cerebro, eran capaces de generar neuronas específicas cuando se las implantaba en los nichos neurogénicos del cerebro (Shihabuddin et al., 2000).

El nicho neurogénico se caracteriza por varios factores. En primer lugar su arquitectura donde destacan, entre otros elementos, la cercanía de las células que lo componen a la vasculatura circundante y las adhesiones entre dichas células así como su anclaje a la matriz extracelular. En segundo lugar, las células que conforman el nicho son, entre otros tipos: células endoteliales, astrocitos, , progenitores, microglia, células endodiales (en el caso de la SVZ) y neuronas maduras (en el caso de la SGZ) (revisado por Lim et al., 2007). Estas células presentan características esenciales que, en el caso de la glía, no expresan

otras células del mismo linaje pero de otras regiones del sistema nervioso central y que convierten el nicho en un microambiente único. Por ejemplo, los astrocitos del nicho secretan señales proneurogénicas (revisado por Lazarov y Marr., 2010; Moreno-Estellés et al., 2012) mientras que astrocitos procedentes de regiones no neurogénicas no promueven ni la proliferación ni la diferenciación neuronal (Song et al., 2002). Estas características de las células del nicho vienen dadas, al menos en parte, por su capacidad de secreción y expresión de moléculas específicas que juegan un papel imprescindible en la regulación y mantenimiento del nicho. Estas moléculas pueden ser desde Wnt, Notch, Sonic Hedgehog o BMPs, hasta factores de crecimiento y neurotrofinas o diversos tipos de neurotransmisores (Tabla I1). De este modo, la clave del mantenimiento homeostático del nicho se encuentra en la preservación de la estructura celular del mismo y por tanto, en el equilibrio entre todas las moléculas señalizadoras pro-proliferativas, diferenciativas y autorrenovantes generadas por los componentes del nicho.

4. Relevancia funcional de la neurogénesis adulta

Algunas de las preguntas que surgieron con el descubrimiento de la neurogénesis adulta fueron si estas neuronas de nueva formación, generadas en el cerebro adulto, maduraban y se incorporaban al circuito neuronal preexistente tanto del OB como del hipocampo, y si tenían alguna función en dichos circuitos. En el caso de la neurogénesis en la SVZ, como ya se ha comentado, se sabe que las neuronas inmaduras migran hasta el OB a través del RMS y allí pasan a formar parte del circuito preestablecido del OB. Este circuito recibe y agrupa los diferentes olores para enviar las señales generadas hasta la corteza olfatoria. En base a esto se han descrito posibles implicaciones de la neurogénesis de la SVZ (revisado por Sakamoto et al., 2014). La más estudiada es la relación de la neurogénesis con la memoria olfatoria. Así, algunos autores sugieren que el bloqueo de la producción de nuevas neuronas mediante distintos métodos, daña el procesamiento de este tipo de memoria (Gheusi et al., 2000; Breton-Provencher et al., 2009). Por otro lado, también parece estar relacionada con el comportamiento innato asociado a la detección de feromonas. En este sentido, algunos autores encuentran una regulación positiva de la neurogénesis durante el embarazo y la lactancia (Shingo et al., 2003) así como en situaciones de búsqueda de pareja (revisado por Sakamoto et al., 2014).

En el caso de la SGZ, entre 2006 y 2009, los grupos de Gage y Schinder (Laplagne et al., 2007; Mongiat et al., 2009) demostraron que efectivamente, esas nuevas neuronas maduraban y se integraban en la SGZ con las mismas características que las neuronas generadas en estadio embrionario. A pesar de que las funciones exactas de las nuevas neuronas no se conocen por completo, se cree que la región dorsal del DG está relacionada con el **aprendizaje** y la **memoria** mientras que la región ventral está relacionada con **comportamientos afectivos** (Bannerman et al., 2002). En cuanto al aprendizaje y la memoria,

TABLA 11: Moléculas implicadas en la regulación del nicho neurogénico y su papel en la Enfermedad de Alzheimer

Función en neurogénesis	Factor	Enfermedad de Alzheimer
↑Proliferación ↑Diferenciación neuronal (Lie et al., 2005)	Wnt	↓expresión ↑GSK3β (Inestrosa y Toledo, 2008)
↑Diferenciación glial ↓Diferenciación neuronal ↑Quiescencia (Bonaguidi et al., 2008; Mira et al., 2010)	BMPs	↑expresión ↓neurogenesis (Li et al., 2008; Crews et al., 2010)
↑Proliferación ↑Autorrenovación (Lai et al., 2003; Balordi et al., 2007)	Shh	↓expresión (revisado por Traiffort et al., 2010)
↓Diferenciación ↑Autorrenovación (Ables et al., 2010; Imayoshi et al., 2010)	Notch	↑NICD (Dominio intracelular de Notch) (Berezovska et al., 1998)
↑↓supervivencia? ↑↓diferenciación? (López-Toledano y Shelanski, 2004; Haughey et al., 2002)	Aβ 1-42	↑expresión ↑patología amiloide (revisado por Goedert y Spillantini, 2006)
↑Neurogénesis (Scharfman et al., 2005)	BDNF	↓expresión (Hock et al., 2000)
↓diferenciación neuronal (Shimazu et al 2006; Delgado et al., 2014)	NT3	↓expresión (Durany et al., 2000)
↑Supervivencia neuronal (Frielingsdorf et al., 2007)	NGF	↑expresión (Scott et al., 1995)
↑Neurogénesis (Rai et al 2007)	FGF-2	↑expresión (Cummings et al., 1993)
↑Proliferación (Aberg et al., 2003)	IGF	↑expresión (O'Neill et al., 2012)
↑Neurogénesis (Jin et al., 2002)	VEGF	↑Supervivencia células de vasculatura (Religa et al., 2013)
↑supervivencia de neuroblastos ↑Neurogénesis (Deisseroth et al., 2004)	Glutamato	↑Neurotoxicidad por exceso de activación de NMDA (Hynd et al., 2004)
↓Proliferación ↑Activación nuevas neuronas granulares (Liu et al., 2005; Ge et al., 2006)	GABA	↑alteración de receptores GABA _A (Rissman et al., 2011)
↑Proliferación (Hoglinger et al., 2004)	Dopamina	↓transportadores (Murray et al., 1995)

existen varias hipótesis sobre cuál podría ser la función de la neurogénesis adulta en ambos procesos. Estas hipótesis plantean funciones diferentes para la neurogénesis pero no necesariamente son excluyentes entre si. La primera hipótesis se refiere a su posible función en la **separación de patrones o tareas de discriminación**. Esta función se refiere a la capacidad de percibir como diferentes dos objetos ó eventos similares. El primer evento marca un patrón en las neuronas maduras mientras que en el segundo, son las neuronas de nueva formación las que almacenan la información diferencial entre el

primer evento y el segundo para poder identificarlos como diferentes. En ausencia de neurogénesis tanto la información común de ambos eventos como la información diferencial, se acumula en las neuronas maduras. Esto hace que aumente la actividad del hipocampo y se produzcan interferencias entre el patrón del primer evento y el del segundo por lo que no se perciben correctamente (McHugh et al., 2007; Morris et al., 2012). Otra hipótesis es la implicación de la neurogénesis en la SGZ en procesos de **codificación temporal**. Esta función se refiere a la capacidad de asociar dos eventos poco ó nada parecidos entre sí debido a su proximidad temporal. Así, dos eventos independientes que se dan próximos en el tiempo, se almacenarán en las nuevas neuronas. Si se diese un tercer evento con una separación temporal respecto a los dos primeros de por ejemplo 3 meses, las nuevas neuronas que lo almacenarían no serían las mismas que las de los eventos 1 y 2 porque éstas ya habrían madurado. Esto hace que el primer y segundo evento se perciban interrelacionados, pero que el tercero se perciba independiente (Morris et al., 2013). Una última hipótesis sería la relacionada con el nivel de **resolución de la memoria**. Esta se refiere a la capacidad de recordar un mayor número de detalles de un evento. Dado que las neuronas maduras acumulan los recuerdos más antiguos y las nuevas los más recientes, la memoria podría presentar una mayor resolución en presencia de una neurogénesis activa y el individuo podría recordar un mayor número de detalles para un evento (Arruda-Carvalho et al., 2011).

La función relacionada con el comportamiento afectivo de la región ventral del DG se basa en la relación observada entre tratamientos antidepresivos o asociados a estrés y el incremento o disminución de la tasa neurogénica (Jacobs et al., 2000). Sin embargo, esta asociación no está plenamente aceptada dados los datos contradictorios propuestos por varios autores (Holick et al., 2008; Kirby et al., 2013.)

La neurogénesis adulta, además de estar regulada mediante moléculas de señalización local, también puede verse afectada por factores extrínsecos que alteran bien de forma positiva (aumentando la producción de nuevas neuronas) como de forma negativa (disminuyendo dicha producción) la neurogénesis. Por un lado existen **reguladores positivos** de la neurogénesis, como el **ejercicio físico** o el **enriquecimiento ambiental** (Van Praag et al., 1999; Brown et al., 2003a). En muchos casos, estos reguladores positivos han sido esenciales para demostrar la relación entre la neurogénesis adulta y la memoria y aprendizaje de los individuos. Así se ha observado que un incremento neurogénico mejora la realización de diversos test comportamentales dependientes de hipocampo (Van Praag et al., 1999; Van Praag et al., 2000; Snyder et al., 2005).

Por otro lado, existen **reguladores negativos** entre los que se encuentran el **envejecimiento** además del estrés o la inflamación. El envejecimiento es el regulador negativo más potente de la neurogénesis adulta en todas las especies (Kuhn et al. 1996). Así, durante el envejecimiento, los animales no sólo obtienen peores resultados en los test comportamentales comparados con los individuos jóvenes sino

que además, el envejecimiento altera vías de señalización claves en el mantenimiento del nicho neurogénico (Shetty et al., 2005).

Existen determinadas enfermedades que ocasionan alteraciones neurogénicas. Sin embargo, resultan difíciles de catalogar como inductoras o represoras de la neurogénesis dada la controversia en los estudios relacionados con ellas. Algunas de estas enfermedades son los tumores cerebrales (Noble y Dietrich, 2004), la epilepsia cuyas convulsiones generan un incremento masivo pero aberrante de la neurogénesis (Jiang et al., 2003), la depresión, la esquizofrenia y algunas enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson (Hoglinger et al., 2004) y la Enfermedad de Alzheimer (EA). En el caso de la EA, y como ocurre con el envejecimiento, muchas vías de señalización básicas en la regulación de la neurogénesis están alteradas (Tabla I1). Este hecho, en conjunto con la pérdida de memoria y las disfunciones de aprendizaje mostrados por los pacientes de EA, apunta a una disfunción de la neurogénesis en el desarrollo de la enfermedad.

5. La Enfermedad de Alzheimer

Esta enfermedad fue descrita por primera vez en 1907 por el neuropatólogo alemán Alois Alzheimer con el nombre de *Dementia Praecox*. Se trata de una enfermedad neurodegenerativa asociada al envejecimiento y que se caracteriza por la progresiva pérdida de memoria y el deterioro de las funciones cognitivas del enfermo (Goedert y Spillantini, 2006). La duración de esta enfermedad es muy variable, entre 2 y 20 años, entre unos individuos y otros. Es una de las grandes enfermedades del siglo XXI en los países desarrollados dada su estrecha relación con el envejecimiento. Sólo en España se detectan entre 5 y 8 casos nuevos anuales por cada 1000 personas (Bermejo-Pareja et al., 2008).

Las características neuropatológicas de la EA son la formación de los denominados ovillos neurofibrilares y de las llamadas placas seniles. Los ovillos neurofibrilares se forman en el interior neuronal debido a la hiperfosforilación de la proteína Tau. Dicha proteína se encuentra de forma habitual asociada a microtúbulos, pero su hiperfosforilación provoca su interacción negativa con los microtúbulos haciendo que estos se desestabilicen y retraigan (Grundke-Iqbal et al., 1986). Las placas se forman en el espacio extracelular y se componen principalmente del péptido Amiloide Beta 1-42 ($A\beta$ 1-42) procedente del procesado proteolítico de la Proteína Precursora Amiloide (APP, del inglés Amyloid Precursor Protein) (revisado por Varela-Nallar et al., 2010). Tanto los ovillos neurofibrilares como las placas seniles, se acompañan de otros procesos patológicos como la gliosis reactiva, la inflamación y la muerte neuronal (Giulian, 1999; Griffin, 2006).

Ambas características patológicas aparecen principalmente en las regiones del cerebro relacionadas con la memoria y las emociones tales como la corteza entorrinal, el hipocampo, la amígdala, el lóbulo frontal

y la corteza temporal y parietal (Clark et al., 2008), siendo especialmente temprana la afectación del hipocampo.

5.1 Moléculas implicadas en la EA que, a su vez, regulan la neurogénesis

Como se muestra en la Tabla I1, existe un gran número de moléculas relacionadas directa o indirectamente con la regulación neurogénica y que, a su vez, sufren alteraciones en condiciones neurodegenerativas como la EA. En este trabajo de tesis doctoral nos hemos centrado en el estudio de dos de ellas, dada bien su relevancia en la patogénesis de la enfermedad o su importancia en la regulación de la actividad de las NSCs y los progenitores.

5.1.1. A β 1-42

Es quizás una de las moléculas más estudiadas en la EA dada su estrecha relación con la formación de las placas amiloides, que, como ya se ha descrito, es una de las principales características patológicas de la enfermedad.

¿Cómo se produce el A β 1-42?

APP, o proteína precursora de A β , es una proteína transmembrana que presenta sitios de corte para las α , β y γ -secretasas. El orden de corte de dichas secretasas define los dos tipos de procesamiento conocidos para la proteína APP (Figura I2). Por un lado existe el **procesamiento no amiloidogénico**, el más común en situaciones no patológicas, que se da gracias al corte inicial de la α -secretasa dentro del dominio del A β (concretamente entre sus residuos 16 y 17), previniendo de esta manera la formación del péptido A β y liberando así el subproducto extracelular soluble correspondiente a la porción N-terminal de APP denominado sAPP α . De este modo quedaría anclado a la membrana el subproducto C-terminal CTF α . Tras el corte de la γ -secretasa, se libera el péptido P3, que aunque no se considera amiloidogénico, es capaz de agregarse y formar algunas placas difusas, y el denominado AICD (del inglés, APP Intracelular Domain). Por otro lado, existe el **procesamiento amiloidogénico**, mucho menos común en condiciones no patológicas y que parece estar incrementado en la EA. En este caso es la β -secretasa también denominada BACE1 (de inglés, β -site APP-Cleaving Enzyme) la que corta APP en el extremo N-terminal del dominio de A β , produciendo un fragmento soluble en el extremo N-terminal de la APP denominado sAPP β y un fragmento transmembrana en el C-terminal llamado C99. El posterior corte de la γ -secretasa en el fragmento C99 libera en el C-terminal el AICD y finalmente el A β , siendo este A β 1-40 o 1-42 dependiendo de la inclusión o exclusión de los dos

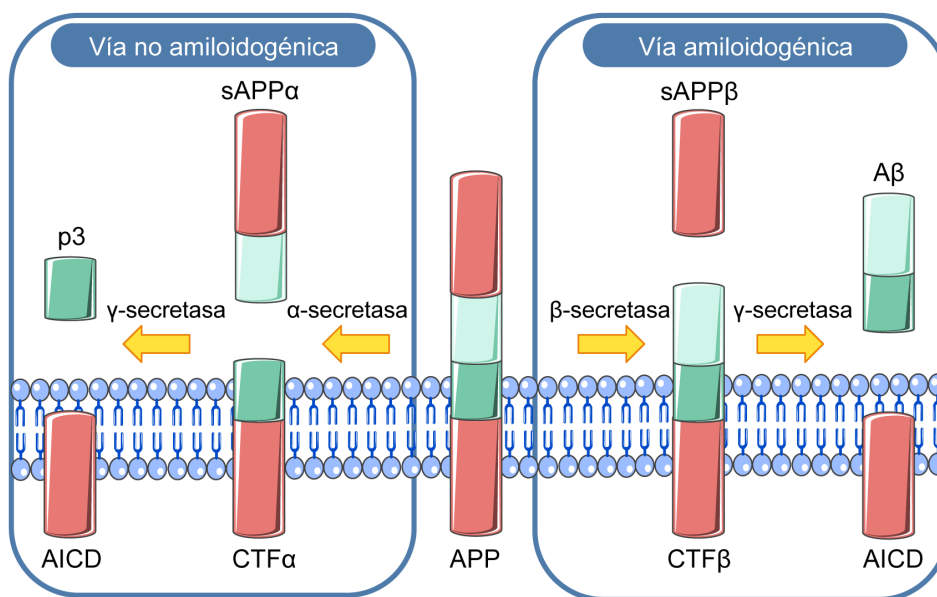


FIGURA I2: Vías de procesamiento de APP. La proteína transmembrana APP puede ser degradada siguiendo la vía no amiloidogénica (izquierda) a través del corte secuencial de las secretasas α y γ . Esta vía genera los subproductos proteolíticos p3 soluble y AICD que queda anclado a la membrana. Por otro lado, APP puede seguir la vía proteolítica amiloidogénica (derecha) mediante el corte secuencial de las secretasas β y γ . Esta vía genera los denominados péptidos A β 1-40 y A β 1-42. Ambas vías se encuentran en equilibrio siendo la no amiloidogénica la principal en condiciones fisiológicas. En condiciones patológicas como la EA, el equilibrio se rompe y la vía amiloidogénica pasa a ser la predominante aumentando significativamente la producción de A β 1-42.

aminoácidos que los diferencian en el corte de la γ -secretasa (revisado por La Ferla y Oddo, 2005). En el caso de la EA, la alteración en el ratio A β 1-40 frente a A β 1-42 resulta determinante dado que la capacidad de A β 1-42 de unirse a otras moléculas también de A β 1-42 y por tanto de agregar formando bien oligómeros ó bien placas amiloides es mayor que la presentada por el A β 1-40.

En situaciones patológicas como la EA, se han descrito más de 30 mutaciones en la secuencia de APP. Estas mutaciones se encuentran principalmente en los sitios de corte con las α , β y γ -secretasas produciendo una mayor incidencia del corte de las β y γ -secretasas, lo que provoca un aumento de la vía amiloidogénica y por tanto un aumento en la producción del producto proteolítico A β 1-42 que forma mayoritariamente las placas seniles (revisado por Selkoe, 2001). Además, se producen mutaciones en las presenilinas 1 y 2 (PS1 y 2). Las presenilinas son una familia de proteínas transmembrana que funciona como parte del complejo proteolítico de las γ -secretasas. Mutaciones en dichas presenilinas, conllevan un incremento del ratio de corte y producción de A β 1-42 frente a A β 1-40. Actualmente se conocen más de 200 de mutaciones en dichas presenilinas. En concreto, las mutaciones presentes en el gen de la PS1 son especialmente abundantes y están asociadas a más de un tercio de los enfermos de Alzheimer de tipo familiar (Selkoe, 2001) (ver apartado 5.2)

¿Qué implicación tiene el A β 1-42 en la neurogénesis?

Curiosamente, algunos de los subproductos derivados del procesamiento proteolítico de APP, parecen tener diversas implicaciones a nivel neurogénico. En el caso de sAPP α parece que su capacidad reguladora está relacionada con la proliferación celular (revisado por Lazarov y Marr., 2010). Además, parece señalar de forma abundante en la SVZ donde regula la proliferación de las células Tipo-C en estado activo EGFR⁺ (Caille et al., 2004; Ohsawa et al., 1999).

La función de A β 1-42 en la neurogénesis sigue siendo controvertida. Por un lado, algunos autores defienden la capacidad neurogénica de dicho péptido en, por ejemplo, células derivadas de la SVZ en desarrollo o procedente de animales jóvenes sin observar variaciones en las tasas proliferativas ni de las NSCs ni de sus células derivadas (Jin et al., 2004; Lopez-Toledano y Shelanski, 2004; Calafiore et al., 2006). Sin embargo, otros investigadores sí observan un incremento proliferativo a concentraciones en el rango micromolar del péptido en NSCs adultas (Heo et al., 2007) apuntando al receptor de neurotrofinas p75 (p75^{NTR}) como uno de los posibles implicados en la vía de señalización de A β 1-42 (Sotthibundhu et al., 2009). Por el contrario, algunos grupos han descrito el efecto negativo de A β en la proliferación y diferenciación de precursores neurales humanos y de roedor en cultivo, provocando la entrada en apoptosis de dichas células (Haughey et al., 2002; Millet et al., 2005) o a través de mecanismos oxidativos (Mazur-kolecka et al., 2006). Sin embargo, cabe destacar la heterogeneidad en dichos estudios en relación a los estados de agregación del péptido A β 1-42 así como en las concentraciones de uso del mismo. Este hecho, podría ser un factor determinante por el que en la actualidad no se ha logrado un consenso en cuanto a la función del A β 1-42 en la neurogénesis, tanto en situaciones fisiológicas como en situaciones patológicas como la EA.

5.1.2. Proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs)

Las BMPs (del inglés, Bone Morphogenetic Proteins) son moléculas clave en el desarrollo del sistema nervioso y que también regulan la neurogénesis adulta. Pertenecen a la superfamilia de citoquinas TGF- β (del inglés, Transforming Growth Factor Beta) representando casi un tercio de dicha superfamilia. Fueron descritas por primera vez en 1965 por su implicación en la generación de hueso y en la gastrulación (Urist, 1965). Se les considera moléculas pleiomórficas dada su gran variedad de funciones en el embrión como por ejemplo la regulación del patrón dorsoventral del tubo neural en el desarrollo, proliferación, gliogénesis, apoptosis y neurogénesis (revisado por Hogan, 1996).

¿Cómo señalizan las BMPs?

Las BMPs se sintetizan como largos precursores proteicos en estado inactivo que necesitan de activación mediante proteólisis del precursor. Esta proteólisis, al menos en estadios embrionarios, se lleva a cabo por la endoproteasa Furina y la PC6 (del inglés, Proprotein Convertase 6) (Cui et al., 1998). Una vez activas,

señalizan como dímeros a través de receptores también pertenecientes a la superfamilia de TGF- β . Existen dos tipos de receptores, los denominados tipo I que son tanto **BMPR1A**, también conocido como Alk3, y **BMPR1B** o Alk6, y los de tipo II como **BMPR2**. Existen también los receptores Activina de tipo I y II aunque estos llevan a cabo una señalización minoritaria (Tsuchida et al., 2009). La transducción de la señal se produce a través de la tetramerización de dos receptores tipo I con dos receptores tipo II (Kawabata et al., 1998). Algunos estudios sugieren que dichos receptores pueden aparecer en la superficie celular como dímeros tipo I y dímeros tipo II, o como complejos preformados heterotetraméricos. Este hecho parece determinar la vía de señalización activada por las BMPs (Hassel et al., 2003).

Así, se puede distinguir por un lado la **vía canónica** de las BMPs (Figura I3) que parece activarse en presencia de complejos heterotetraméricos preformados de receptores. Esta vía activa la señalización a través de las proteínas de unión a DNA, SMAD1, SMAD5 y SMAD8 conocidas en conjunto como SMAD reguladas por el receptor o R-SMADs. Cada R-SMAD o grupo de SMAD1/5/8 interacciona con SMAD4 comportándose como factor de transcripción y regulando la expresión de varios genes. Algunos de estos genes son Hes1 y 5, cuya actividad inhibe la neurogénesis, Id1, 2, 3 y 4, cuya función es impedir la diferenciación, o el inhibidor de ciclo celular p21^{cip/waf1} (Itoh et al., 2000; Ogata et al., 1993). Por otro lado, las BMPs pueden señalizar a través de la **vía no canónica** que es independiente de las proteínas SMAD y en la que los receptores se encuentran como homodímeros (sin preformar un complejo heterotetramérico). Algunos ejemplos serían la activación de MAPKs como ERK y p38-MAPK a través del reclutamiento del receptor tipo II que, tras la unión de las BMPs, activa dichas cascadas de señalización (Iwasaki et al., 1999; Kozawa et al., 2002).

In vivo ambas vías de señalización se regulan a través de los antagonistas de las BMPs que directamente se unen a dichas BMPs y secuestran el ligando. Entre los antagonistas conocidos por el momento destacan Noggin, Follistatin, Chordin, y Neurogenesin-1.

¿Qué implicación tienen las BMPs en la neurogénesis y en la EA?

En términos generales, las BMPs son reguladores negativos de los nichos neurogénicos de la SVZ y la SGZ (Coskun et al., 2001; Colak et al., 2008). Esto se debe a su capacidad de bloquear la proliferación y la neurogénesis tanto *in vivo* como *in vitro* (Lim et al., 2000; Bonaguidi et al., 2008) favoreciendo la diferenciación glial a expensas de la neuronal (Bonaguidi et al., 2005). Así, las BMPs mantienen la quiescencia de las NSCs y previenen la depleción prematura de dicha población. Esta función se lleva a cabo a través de la vía canónica, de modo que la depleción del receptor BMPR1A así como de SMAD4, resulta en un efecto similar al obtenido mediante la infusión del antagonista de las BMPs, Noggin (Mira et al., 2010).

El equilibrio entre la activación e inhibición de la vía de las BMPs es una de las claves para la neurogénesis adulta, pues la activación permite la preservación de las NSCs gracias a su quiescencia,

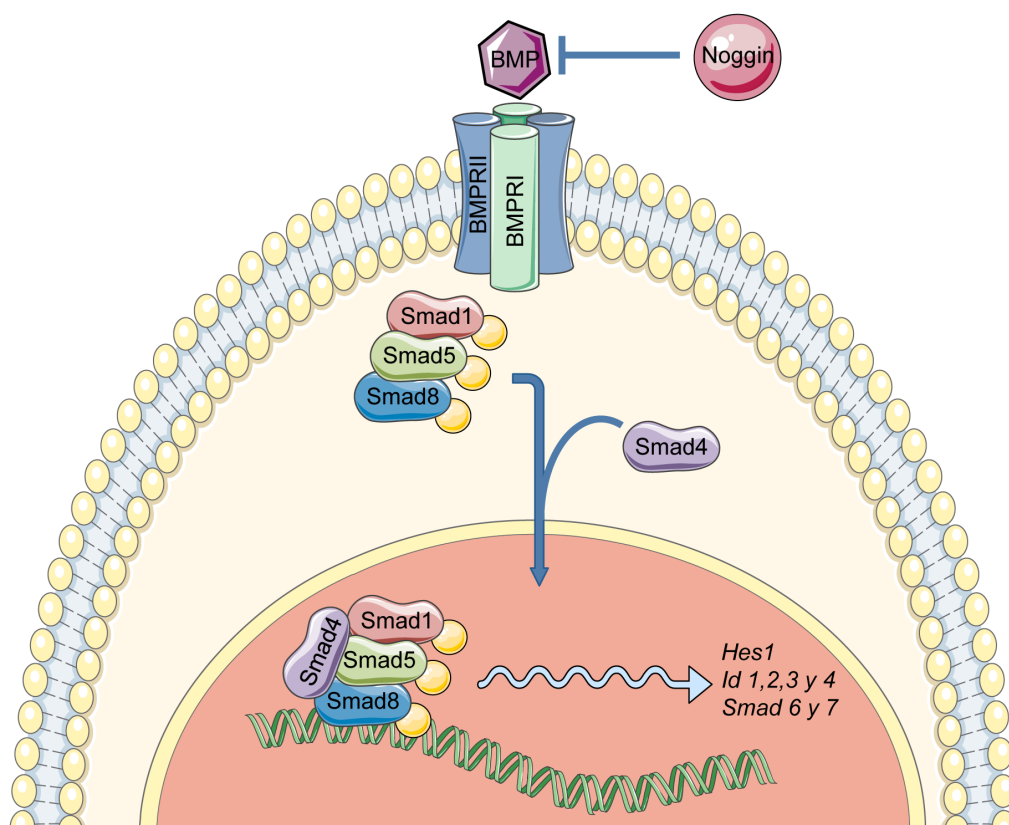


FIGURA 13: Vía canónica de la señalización por BMPs. En presencia de ligando y ausencia de antagonistas como Noggin, los receptores tipo-I y tipo-II se unen formando heterotetrámeros que inducen la fosforilación de las proteínas SMAD 1/5/8 formando el denominado R-SMAD. Este R-SMAD interacciona con SMAD4 para actuar como factor de transcripción implicado en la regulación de genes que inhiben la diferenciación neural y favorecen la quiescencia celular.

mientras que la inhibición transitoria permite la proliferación y renovación neuronal. Este hecho se produce *in vivo*, entre otros factores, gracias a la expresión del antagonista Noggin por parte de las células endoteliales en la SVZ (Lim et al., 2000) y del antagonista Neurogenesis-1 por parte de la astrogliá (Ueki et al., 2003)). Noggin aumenta la activación de los precursores neurales e incrementa la neurogénesis, sin embargo, una expresión prolongada de Noggin conlleva la depleción de los precursores y la pérdida de neurogénesis (Mira et al., 2010).

Durante los últimos años, cada vez más autores relacionan la activación de la vía de las BMPs con la patología de la EA. Así, se ha observado en algunos modelos murinos genéticos de la EA como es el APPswe/PS1ΔE9, una sobreexpresión de BMP4 a nivel hipocámpal y una represión de la expresión de Noggin. Este hecho, correlaciona con una disminución de la proliferación en el nicho de la SGZ. Sin embargo, el bloqueo de la actividad de BMP4 tanto con oligonucleótidos antisentido (Li et al., 2008) como mediante la infusión de Noggin (Tang et al., 2009), permite la reversión del descenso neurogénico. Además, la proteína BMP6 muestra niveles elevados en el hipocampo de pacientes con EA así como

en el modelo murino transgénico de la enfermedad mThy1-hAPP751 (Crews et al., 2010). Este hecho concuerda con los ensayos *in vitro* que observan un incremento de BMP6 tras el tratamiento de los precursores neurales con A β 1-42 (Crews et al., 2010). Además, la presencia de BMP6 inhibe la neurogénesis hipocampal en procesos de estimulación como el ejercicio voluntario (Gobeske et al., 2009).

5.2. Aspectos genéticos de la EA

La EA puede clasificarse en dos tipos según su origen o etiología. La denominada forma esporádica, que representa más de un 95% de los casos de la EA, y la forma familiar de carácter autosómico dominante, que representa menos del 5% de los casos de la enfermedad (Campion et al., 1999).

La **EA familiar** muestra sus primeros síntomas antes de los 65 años de edad del individuo y presenta un patrón de herencia típicamente mendeliano. En la actualidad se sabe que este subtipo de la enfermedad se debe a la presencia de mutaciones puntuales en la proteína APP, presenilina-1 y presenilina-2 anteriormente descritas, lo que incrementa la producción de A β 1-42 favoreciendo el proceso de agregación y producción de las placas amiloides (Bird, 2008).

En cuanto a la otra gran característica de la EA, la hiperfosforilación de Tau, resulta curioso que no se hayan encontrado mutaciones en el gen de dicha proteína en los enfermos de EA. Esto apoya la “hipótesis de la cascada amiloide” que sugiere que la acumulación mayoritaria del péptido A β 1-42 provoca una cascada de reacciones que originan la patología de tau y así la muerte neuronal (revisado por Hardy, 2002).

Por otro lado, la **EA esporádica** no tiene un origen genético tan claro como la familiar lo que apunta a un posible origen multifactorial. Suele aparecer a edades más avanzadas de entre 60-65 años de edad. A pesar de que el envejecimiento no parece ser la causa directa de esta enfermedad, se cree que es el mayor factor de riesgo dado que la incidencia de la EA aumenta de forma exponencial a partir de los 65 años (Kawas y Corrada, 2006). Existen otros factores de riesgo de la enfermedad como es la exposición a distintos agentes ambientales como pesticidas, metales o virus (Doty, 2008). También existen factores de riesgo vascular como tabaquismo, hipertensión, obesidad, fibrilación auricular o diabetes (Ott et al., 1999). Además, existen algunos factores de riesgo genético en la EA esporádica, el más conocido y demostrado es la variante alélica E4 del gen de la apolipoproteína E (ApoE). La APOE regula la concentración de colesterol y triglicéridos en sangre. Se sintetiza en el sistema nervioso principalmente por los astrocitos y microglía de forma mayoritaria y son las neuronas las que expresan los receptores para APOE. El gen que codifica dicha proteína puede presentar tres alelos: el E3, el más común y extendido, el E2 que parece presentar efecto protector frente a la EA y finalmente el E4, que favorece la aparición de la enfermedad a una edad más temprana (Poirier et al., 1993; Raber et al., 2004).

5.3. Modelos murinos de la EA familiar

Aunque la EA de tipo familiar es la vertiente con menos casos de la enfermedad, el hecho de que se induzca por mutaciones de tipo puntual en las proteínas APP y presenilinas 1 y 2, hace relativamente fácil la generación de modelos murinos de la enfermedad portadores de dichas mutaciones. Sin embargo, es verdad que no existe ninguno de dichos modelos que exhiba todas las características patológicas de la EA desarrollada en humanos. El modelo murino ideal para la EA debería presentar todas las características clínicas y patológicas de la enfermedad, desde los déficits cognitivos y de comportamiento, hasta la presencia de placas amiloides, gliosis, pérdida sináptica, ovillos neurofibrilares, pérdida neuronal y neurodegeneración.

Dentro de los modelos genéticos se podrían establecer varios subgrupos. En este caso, nos centraremos en tres de ellos. Por un lado están los animales transgénicos que portan la proteína **APP humana mutada**, es probablemente el grupo más numeroso dado que existen modelos para cada una de las mutaciones descritas. Además del tipo de mutación, la expresión de la proteína APP se controla bajo diferentes promotores en cada uno de los modelos existentes, lo que provoca diversos niveles y patrones de expresión espacial. Por otro lado, cada modelo ha sido generado en diversos fondos genéticos lo que incrementa más incluso la variabilidad entre los distintos modelos genéticos. Algunos de los modelos más empleados de este grupo son por ejemplo PDAPP (con la mutación Indiana de APP bajo el promotor PDGF- β , Games et al., 1995; Rockenstein et al., 1995), J20 (portador de la mutación Indiana y Sueca bajo el control del promotor PDGF- β , Mucke et al., 2000), mThy-hAPP751 (portador de las mutaciones sueca y london bajo el promotor Thy1, Rockenstein et al., 2001) ó Tg2576 y APP23 (ambos portan la mutación sueca en APP bajo los promotores HamPrP, proteína priónica de hámster, y Thy1 respectivamente, Hsiao et al., 1996; Sturchler-Pierrat et al., 1997).

Otro gran subgrupo dentro de los modelos genéticos de la EA son los modelos transgénicos que portan la proteína **APP y la presenilina 1 humanas mutadas**. En algunos casos, los animales mutantes sólo para PS1, como es el ejemplo del PS1(A246E), son prácticamente asintomáticos hasta edades avanzadas de, en este caso, 2 años y apenas muestran alteraciones conductuales con la edad (Schneider et al., 2001). Es por ello que se usa la combinación de APP humano mutado junto con PS1 mutante. Así, existen modelos como PS/APP (es el modelo antes mencionado Tg2576 con la mutación M146L de la PS1 bajo el promotor PDGF- β , Holcomb et al., 1998). El modelo APPswe/PS1 Δ E9 (porta cada una de las mutaciones bajo promotores independientes de mPrP, Jankowsky et al., 2001) o el modelo denominado 5xFAD (con las mutaciones sueca, florida y London en APP bajo el promotor Thy1 y 2, y M146L y L286V en PS1 bajo el promotor Thy1; Oakley et al., 2006).

Finalmente, existe un tercer grupo que se compone de 2 modelos que presentan **APP, PS1 y TAU humanos mutados**. El primero es el llamado triple transgénico o 3xTg que presenta la mutación

APPswe, M146V en PS1 y P301L en Tau, todas ellas bajo el promotor Thy 1.2 (Oddo et al., 2003). El segundo modelo es el PLB1-triple que presenta las mutaciones APP sueca y london, A246E en PS1 y P301L y R406W en Tau, todas ellas bajo el promotor CaMKII- α (Platt et al., 2011).

5.4. SAMP8 como posible modelos murino de la EA esporádica

La mayoría de investigaciones actuales, apuntan al carácter multifactorial que conlleva el origen de la EA esporádica, esta circunstancia hace difícil generar un modelo murino que simule de forma rigurosa la EA de comienzo tardío. Sin embargo, de un tiempo a esta parte, algunos autores apuntan a los animales SAMP8 (del inglés, Senescence-Accelerated Mouse Prone 8, referidos en esta tesis como P8) como posible modelo de utilidad para el estudio de esta enfermedad y a los animales SAMR1 (del inglés Senescence-Accelerated Mouse Resistant 1, referidos en esta tesis como R1) como su cepa control. Fue en 1981 cuando Takeda y colaboradores mostraron por primera vez la cepa SAM (del inglés Senescence-Accelerated Mouse) y en 1997 cuando la describieron de forma más detallada. Esta cepa desarrollada a partir de la cepa AKR/J, donada por los laboratorios Jackson en 1968, consistía inicialmente en 9 grupos de animales SAMP y en 3 grupos de animales SAMR. Estos investigadores se dieron cuenta de que en algunas camadas, muchos de los animales mostraban un grado de moderado a severo de pérdida de actividad, de pelo, de brillo así como lesiones perioftálmicas, lordocifosis y una reducida esperanza de vida. Además, en la autopsia de algunos de ellos se observaban depósitos amiloideos, abscesos y linfomas. De este modo decidieron separar y mantener en condiciones consanguíneas a los animales que presentaban estas características de envejecimiento prematuro (SAMP) de los animales que no las presentaban (SAMR). En la actualidad existen principalmente 8 cepas de los animales SAMP (SAMP1, SAMP2, SAMP3, SAMP6, SAMP7, SAMP8, SAMP9 y SAMP10) y 3 cepas de los animales SAMR (SAMR1, SAMR4 y SAMR5). Todas estas cepas presentan diferencias en cuanto a su fenotipo, como por ejemplo el diverso grado de afectación de los órganos, la incidencia de células linfoides o la esperanza de vida (Takeda et al 1997). Sin embargo, en ningún caso se trata de cepas modificadas genéticamente.

Con el paso del tiempo la cepa P8 no sólo se ha aceptado como modelo de envejecimiento, si no que se ha propuesto como un posible modelo de la EA dado que estos ratones muestran lesiones asociadas con la EA de forma dependiente a su edad (revisado por Morley et al., 2012). Algunas de estas lesiones son el incremento del estrés oxidativo (Yasui et al., 2003), acúmulos de A β (aunque hasta el momento no se ha demostrado su tinción con rojo congo), la gliosis y la hiperfosforilación de Tau (Canudas et al., 2005). En relación a la patología relacionada con el A β , los animales P8 muestran un incremento de la proteína APP asociado a la edad (Kumar et al., 2000; Morley et al., 2000; Nomura et al., 1996). Además, se han descrito déficits cognitivos en estos animales que pueden revertirse mediante oligonucleótidos antisentido, diseñados contra el mRNA de APP, o mediante la administración de anticuerpos contra A β

(Kumar et al., 2000; Kumar et al., 2001; revisado por Morley, 2002; Poon et al., 2004). Por otro lado, algunos estudios de comportamiento realizados sobre dichos animales, muestran la existencia de alteraciones neuroquímicas y cognitivas que también están presentes en los pacientes de EA, incluyendo una pérdida progresiva de memoria (revisado por Pallàs et al., 2008). A nivel genético, los animales P8 muestran 51 mutaciones puntuales en comparación con los animales R1 (Delerue et al., 2013). Al menos el 50% de los genes identificados con mutaciones puntuales en los P8, desarrollan funciones en el cerebro. Algunos de estos genes codifican para kinasas y fosfatasa (PTPRD, TESK1 o TMEM55B) que pueden regular potencialmente la fosforilación de Tau. Además también aparece mutado IRS2 (del inglés, Insulin Receptor Substrate 2) que es un regulador negativo de la memoria así como un inhibidor de la potenciación a largo plazo inducida a través del receptor NMDA (Irvine et al., 2011; Martin et al., 2012).

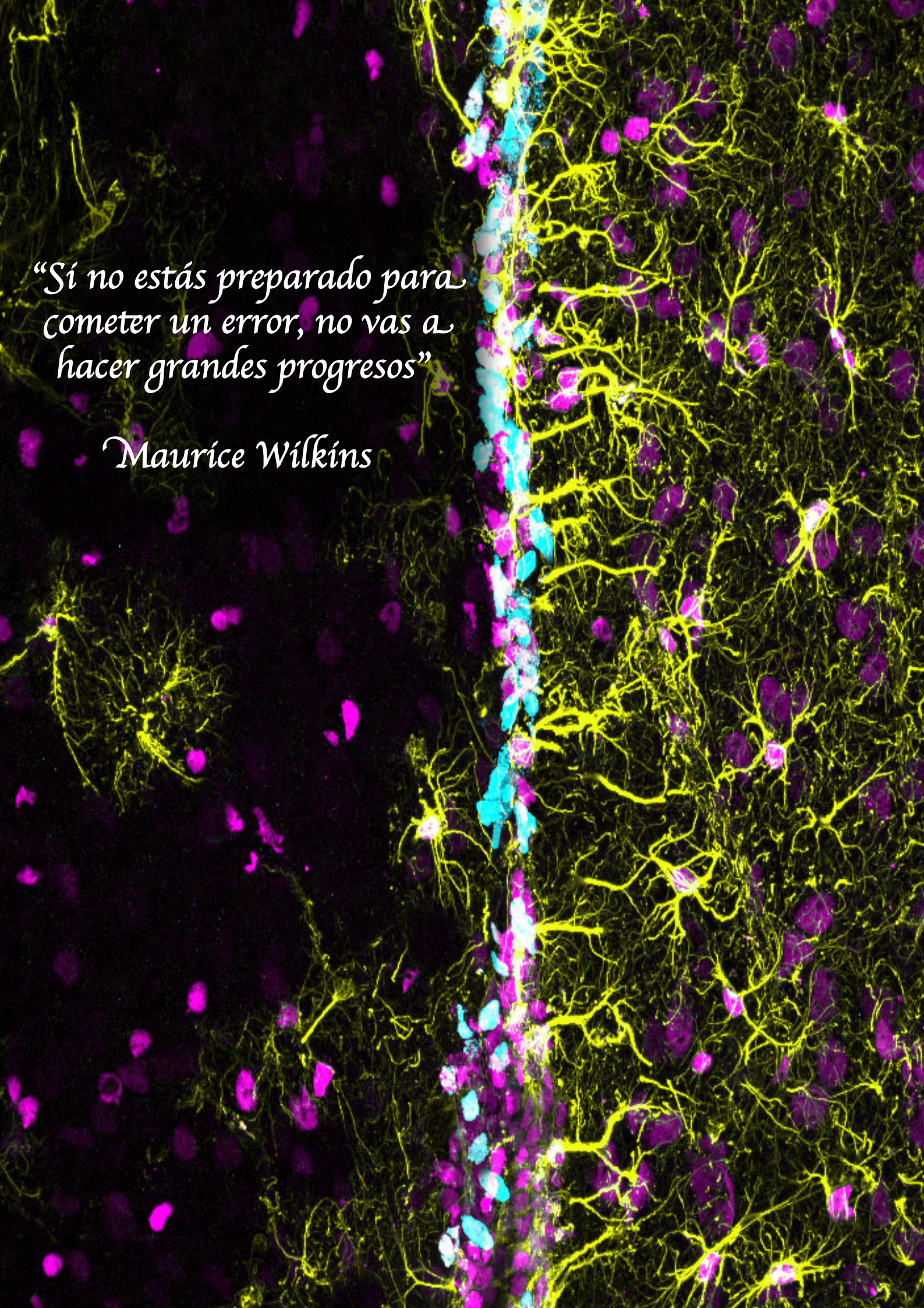
Todo esto en conjunto sugiere que la cepa SAMP8 puede constituir un buen modelo complementario a los modelos transgénicos en el estudio de la EA esporádica.

6. Efecto de la EA sobre la neurogénesis: ¿es un regulador positivo o negativo?

La disfunción neurogénica y su implicación en la EA está cada vez más estudiada. Algunos autores sugieren que las alteraciones en la neurogénesis pueden ser relevantes en la EA teniendo en cuenta la pronta afectación del hipocampo en la enfermedad. Este hecho podría explicar la pérdida de memoria, desorientación y alteraciones comportamentales, así como alteraciones en moléculas esenciales en la homeostasis del nicho. Sin embargo, existen resultados contradictorios acerca de la desregulación positiva o negativa de la neurogénesis en la EA.

En muestras hipocampales de enfermos de EA, se ha descrito tanto un incremento (Boekhoorn et al., 2006) como un descenso de la proliferación y la neurogénesis (Crews et al., 2010; Nagy et al., 1997). En el caso de los modelos murinos de la enfermedad, la mayoría de los autores muestran un descenso en la proliferación de las células precursoras y un descenso de la tasa de supervivencia de las neuronas de nueva formación. Los modelos transgénicos portadores de una única mutación en APP (Donovan et al., 2006) o en la presenilina 1 PS1 (Wang et al., 2004; Wen et al., 2004) así como dobles mutantes APP/PS1 (Demars et al., 2010; Zhang et al., 2007) y triples transgénicos 3XTg (Rodríguez et al., 2008) muestran una disminución de la neurogénesis que correlaciona con la presencia de placas amiloides. Sin embargo, dobles y triples mutaciones en APP suelen conllevar un incremento de la proliferación de las células precursoras (Ermini et al., 2008; Jin et al., 2004; Lopez-Toledano y Shelanski, 2007; Mirochnic et al., 2009). Estos resultados, en apariencia contradictorios, entre los diversos modelos genéticos de la enfermedad, pueden encontrar su explicación científica en las diversas estrategias empleadas para dirigir la expresión del transgen. Estas estrategias pueden provocar una mayor o menor producción de

A β 1-42 favoreciendo su estado soluble en forma de monómeros u oligómeros, o su agregación en placas amiloides. Además, existen diferencias entre los paradigmas de administración de BrdU y las edades de análisis de los animales que emplean los diversos autores para llevar a cabo sus estudios neurogénicos, lo que igualmente puede generar diversidad de resultados. Finalmente, el fondo genético de los animales transgénicos puede producir variaciones en la edad de aparición de los primeros síntomas de la enfermedad, así como de sus características principales como son la formación de placas amiloides (Mu y Gage, 2011; Rodriguez y Verkhatsky, 2011; Winner et al., 2011).

The background of the image is a complex, abstract pattern. It features a dense network of thin, yellow, branching lines that resemble a neural network or a microscopic view of a material. These yellow lines are interspersed with small, bright blue and cyan spots. The entire pattern is set against a solid black background, creating a high-contrast, textured effect.

*“Sí no estás preparado para
cometer un error, no vas a
hacer grandes progresos”*

Maurice Wilkins

objetivos

OBJETIVOS


El **PRIMER OBJETIVO** de esta tesis ha sido verificar la edad a la que los animales SAMP8 presentan alteraciones relacionadas con el envejecimiento, así como patologías asociadas a la Enfermedad de Alzheimer. La finalidad de este objetivo fue establecer el rango de edades consideradas anteriores y posteriores a la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad, para poder diseñar el resto del estudio.

El **SEGUNDO OBJETIVO** de esta tesis ha sido la caracterización de la actividad de las NSCs, en la SVZ de animales SAMP8, principalmente en estadíos anteriores a la aparición de la patología de Alzheimer. Para ello se plantearon los siguientes subobjetivos:

- ◆ Determinar la actividad proliferativa de la SVZ de animales SAMP8 frente a su control SAMR1.
- ◆ Analizar específicamente la población de NSCs de la SVZ de animales SAMP8 y SAMR1.
- ◆ Estudiar el comportamiento *in vitro* de los cultivos de neuroesferas de animales SAMP8 y SAMR1.
- ◆ Probar la implicación de mecanismos autocrinos y/o paracrinos en la desregulación de la actividad de las NSCs de los animales SAMP8 y la vía de señalización afectada.

El **TERCER OBJETIVO** de esta tesis ha sido la caracterización de la actividad de las NSCs, en la SGZ de animales SAMP8, en estadíos anteriores a la aparición de la patología de Alzheimer. Para ello se plantearon los siguientes subobjetivos:

- ◆ Determinar *in vivo* la actividad proliferativa de la SGZ de animales SAMP8 frente a su control SAMR1.
- ◆ Analizar la dinámica celular de las NSCs y de las células derivadas de ellas para poder estudiar posibles alteraciones en la neurogénesis y gliogénesis de la SGZ de animales SAMP8 y SAMR1.
- ◆ Caracterizar la posible desregulación de la vía de señalización de las BMPs en los animales SAMP8 y establecer su regulación con el fenotipo observado.



*“La humanidad también necesita soñadores,
para quienes el desarrollo de una tarea sea tan
cautivante que les resulte imposible dedicar
su atención a su propio beneficio”*

Marie Curie

**materiales y
métodos**

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales

Las cepas empleadas para el estudio principal de esta tesis fueron SAMR1 (Senescence Accelerated Mouse Resistant 1) y SAMP8 (Senescence Accelerated Mouse Prone 8). Dichas cepas no transgénicas se derivaron a partir de la cepa AKR/J.

Los animales de la cepa SAMP8 son susceptibles de sufrir envejecimiento prematuro frente a la cepa SAMR1, resistente a dicho envejecimiento, y por tanto aceptada como cepa control (Takeda et al., 1981). Ambas cepas fueron cedidas por la Dra. Mercè Pallàs de la Universidad de Barcelona. Como control de las características básicas de animales salvajes, se emplearon ratones Crl:CD1(ICR) procedentes de la compañía Charles River (les Oncins, Francia) así como ratones C57/Bl6 cedidos por el Instituto de Salud Carlos III. Todos los animales fueron estabulados y manipulados según lo establecido por el Comité de Ético de la Investigación y del Bienestar Animal (CEIyBA) del Instituto de Salud Carlos III. Además, las cepas SAMR1 y SAMP8 fueron estabuladas en condiciones libres de patógenos específicos (SPF) y cruzadas siguiendo las mismas características descritas por Tanaka (Tanaka et al., 2005).

Los animales empleados fueron machos con edades comprendidas entre el mes y los 14 meses ahondando principalmente en el estudio a los 2 meses.

2. Métodos *in vivo*

2.1. Inyección de análogos de timidina

La 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU, Sigma B5002) es un análogo estructural del nucleótido timidina que se incorpora al DNA de las células que se encuentran en fase S en el momento de su administración. De este modo, tras el procesado del tejido, permite detectar las células que han quedado marcadas mediante el uso de un anticuerpo anti-BrdU. La BrdU se administró a animales adultos, mediante

inyecciones intra-peritoneales (Jeringuilla 1ml BD 25GA) de una solución de BrdU (10 mg/ml en solución salina estéril, NaCl 0,9 %) con un volumen adecuado al peso del animal para conseguir una dosis de 50 mg de BrdU/kg de peso del animal (Moreno-Estellés et al., 2012). Los regímenes empleados en cada estudio fueron los siguientes:

2.1.1. Estudio de la actividad proliferativa en la SVZ e HC de SAMR1 y SAMP8

Se inyectó BrdU cada 2 horas un total de 3 veces y una hora después de la última inyección, se sacrificaron los animales. Este régimen marca positivamente con BrdU todas las células que pasan por fase S durante las 5 horas de administración del análogo.

2.1.2. Estudio de la dinámica celular en el HC (Ensayos de Pulso-caza)

Se inyectó una única vez BrdU y se sacrificaron los animales a distintos tiempos (2h, 1d, 3d, 7d, 14d y 21d). De este modo, el marcaje con BrdU combinado con distintos marcadores específicos de las diversas poblaciones celulares, nos permite estudiar la dinámica celular del proceso de neurogénesis.

2.2. Infusión de Noggin a través de mini-bombas osmóticas

2.2.1. Montaje de las bombas

Las mini-bombas osmóticas comercializadas por Alzet (modelo 1007D) así como el kit de infusión (Alzet 0008851) (Figura M1) se implantaron durante una semana en el cerebro de ratones R1 y P8 de 2 meses de edad, siguiendo las recomendaciones del fabricante y protocolos previos del laboratorio (Moreno-Estellés et al., 2012). El día previo a la implantación de las bombas, éstas se cargaron con la proteína recombinante murina Noggin (25 µg/ml, Peprotech 250-38) o con solución vehículo (suero salino, NaCl 0,9 %) y permanecieron equilibrándose toda la noche en suero salino a 4°C en agitación para asegurar el correcto funcionamiento de la bomba (Figura M1 A). Con la ayuda de la jeringuilla roma que incluye el kit, se cargó la bomba (Figura M1 B). Para cargar las bombas, en primer lugar, se pesaron en vacío para controlar que el volumen de carga del vehículo o de Noggin en cada caso fuese el correcto y se verificó el incremento en al menos un 80 % de su peso seco. A continuación, se empleó un catéter de 3 cm de longitud para conectar la cánula de infusión de 3 mm de profundidad con el moderador de flujo de la bomba y, con la ayuda de la aguja roma, se cargó el interior del moderador, catéter y cánula con suero salino (Figura M1 C). Por último, se ensambló el moderador de flujo con la bomba poniendo especial cuidado en la presencia de burbujas que pudieran obstruir el flujo (Figura M1 D). De este modo, el flujo de las bombas fue de 0.5 µl/h durante 7 días.

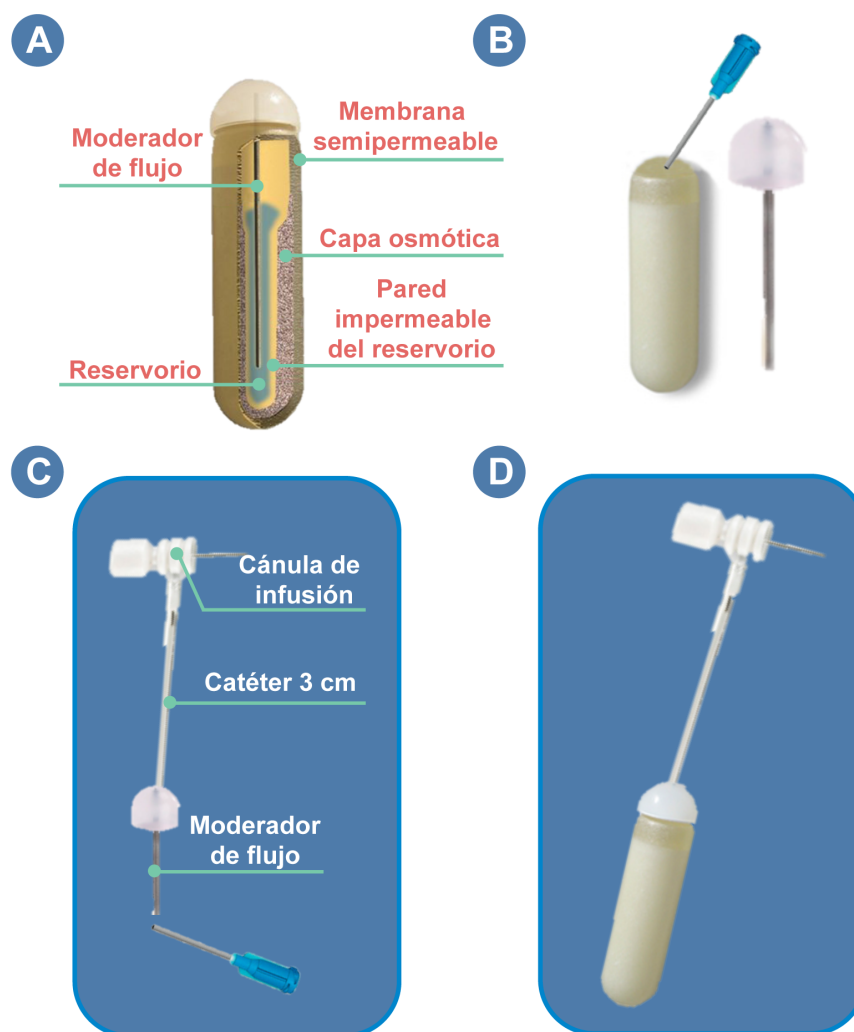


Figura M1. Estructura y montaje de las mini-bombas osmóticas. (A) Descripción de los componentes internos de la mini-bomba que permiten la liberación progresiva de la molécula de interés. (B) Las mini-bombas deben cargarse con una aguja de extremo romo hasta completar al menos un 80% de su peso seco. (C) La cánula de infusión que se adhiere al cráneo y el moderador de flujo que se inserta en la bomba, deben unirse por un catéter de 3 cm. Una vez ensamblados, deben cargarse con suero fisiológico con precaución de no dejar burbujas en su interior. (D) Aspecto general de la mini-bomba tras su proceso de montaje.

2.2.2. Implantación de las bombas

Para el procedimiento quirúrgico, los animales fueron anestesiados con una solución compuesta por ketamina 10% (v/v, Imalgene 1000, Merial Laboratorios) y xilacina 9,3% (v/v, Xilagesic, Carier) en PBS 1X estéril. La dosis administrada por vía intraperitoneal fue de 200 μ l de solución anestésica por cada 25 g de peso del animal. Una vez dormidos, se realizó un corte longitudinal de la piel del animal a lo largo de la línea media del cerebro para exponer el Bregma. Después, con la ayuda de una tijera roma, se separó la piel de la espalda del animal de la musculatura para introducir la bomba en ella. Una vez hecho esto y con la ayuda de un estereotáxico (MyNeurolab, Benchmark), se implantó la cánula en coordenadas 0.0

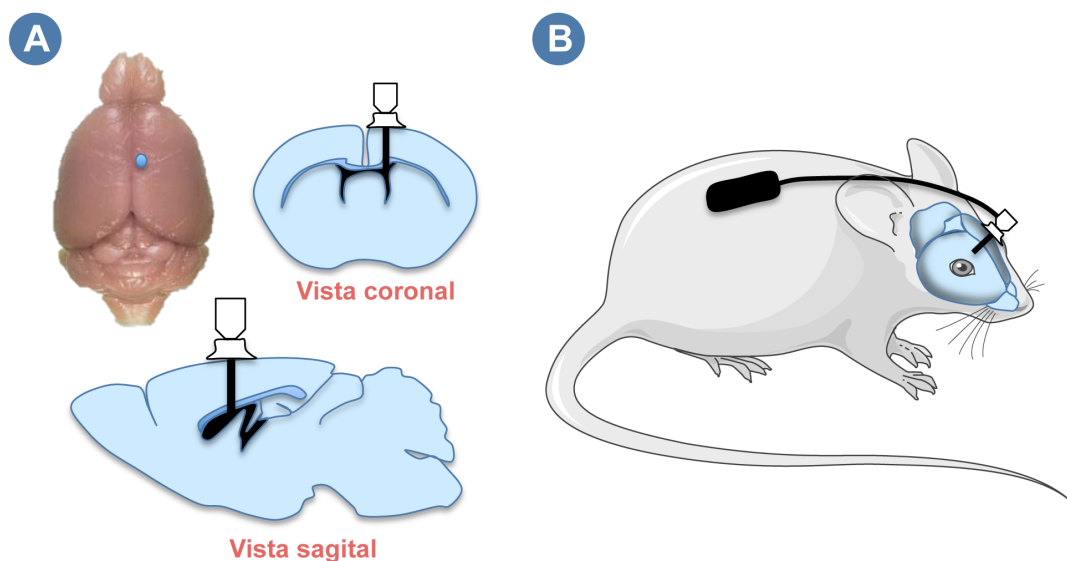


Figura M2. Esquema de las coordenadas de implantación de las mini-bombas osmóticas. **(A)** Coordenadas de inserción de la bomba en 0,7 mm al Bregma observado desde la vista coronal y 0,0 anteroposterior observado desde la vista sagital. **(B)** Localización final de la cánula de infusión en el cráneo y de la mini-bomba en la parte dorsal del animal.

anteroposterior (Bregma), 0,7 mm mediolateral derecho (Figura M2 A) quedando fijada al cráneo mediante el uso de pegamento tisular Hystoacryl (B/Braun 1050044) (Figura M2 B). La herida también fue suturada con Hystoacryl y se les administró de forma intraperitoneal una solución analgésica compuesta por meloxicam 10 % (v/v, Metacam, Boheringer-Ingelheim) en PBS 1X estéril a razón de 100 ml por cada 25 g de peso del animal. La reversión de la anestesia se llevó a cabo con una solución compuesta por un antagonista alfa-2 adrenérgico al 7,7 % (v/v, Antisedan, Esteve) en PBS 1X estéril y en la misma dosis que el analgésico (100 ml/ 25 g de peso de animal). Una vez recuperados, los animales se mantuvieron en jaulas independientes y en condiciones SPF.

2.3. Técnicas histológicas

2.3.1. Fijación

Los animales utilizados en el análisis *in vivo* fueron sacrificados mediante sobredosis de Isoflurano (IsobaVet® 100 % Schering-plough, 100 % v/v). A los animales empleados para el estudio anatomopatológico, se les extrajeron todos los órganos a excepción del cerebro. El resto de animales se sometieron a perfusión intra-cardiaca con paraformaldehído (PFA, Panreac, 141451) al 4 % (p/v) en tampón fosfato (PB) 0,1 M, pH 7,4 según lo descrito en Moreno-Estellés et al. 2012. Para ello, se realizó una toracotomía además de un corte en la carótida y se procedió a inyectar, con ayuda de una

jeringuilla BD 20 ml 23GA, inicialmente 20 ml de solución salina, NaCl 0,9 % a través del ventrículo izquierdo del animal para desplazar la sangre de los vasos sanguíneos. Posteriormente se inyectó en el mismo ventrículo 40 ml de PFA 4 %. En el caso de los animales empleados en el estudio de anatomía patológica del resto de órganos, fueron fijados en formalina 4 % para posteriormente se embebidos en parafina y procesados en el microtomo. Estos tejidos, fueron analizados por la Unidad de Veterinaria del Instituto de Salud Carlos III.

2.3.2. Postfijación

Tras la extracción de los cerebros, se les sometió a postfijación por inmersión en PFA 4 % durante toda la noche a 4°C en agitación. Posteriormente se realizaron varios lavados con PB 0,1 M y, según las necesidades experimentales, se prepararon para ser procesados en el criostato, en el vibratomo o se sumergieron en PB 0,1 M con azida sódica al 0,05 % (p/v) a 4°C hasta el momento de su uso.

2.3.3. Procesamiento del tejido

Todo el tejido, a excepción del empleado en el análisis anatomopatológico, fue procesado con orientación coronal mediante distintos instrumentos de procesado:

A. Material procesado en criostato:

Mediante esta técnica se procesaron los tejidos empleados en la caracterización de la SVZ así como del OB. Los cerebros se crioprotegieron por inmersión en sacarosa 30 % (p/v) en PB 0,1 M para evitar la formación de cristales debida a la congelación del agua presente en el tejido. Posteriormente se encastraron en medio de congelación de tejidos (Tissue-Tek, Sakura 4583 Finetek Europe) y se procesaron en congelación (Leica Microsystems CM-1950) generando secciones de 30 µm que se recogieron en series de 10 portaobjetos, de forma que cada portaobjetos contenía una reconstrucción antero-posterior de 6 secciones del cerebro separadas 300 µm entre cada una de ellas. De este modo, se analiza una sección cada 300 µm de tejido. Los portaobjetos estaban tratados con gelatina-alumbre de cromo (alumbre de cromo al 0,2 %, gelatina al 0,5 % y azida sódica al 1 %), para favorecer la adhesión de los cortes tisulares. Todas las secciones se almacenaron a -20°C para asegurar su preservación hasta el momento de su uso.

B. Material procesado en vibratomo:

En este caso, los cerebros se cortaron con un grosor de 40 µm (Leica Microsystems VT-1200-S) y los cortes resultantes se recogieron en una placa MW96 (Falcon 353072) generando 8 series que contenían una reconstrucción antero-posterior de 7 cortes separados entre si 320 µm. Dichos cortes permanecen

flotantes en PB 0,1 M con azida sódica (Panreac, 122712) al 0,05 % (p/v) a 4°C hasta el momento de su uso.

C. Material procesado en microtomo:

Los órganos en los que se estudió la anatomía patológica, fueron cortados empleando un micrótopo Leica RM2135 en secciones de 6 µm de grosor y recogidos en portaobjetos. Dichos tejidos fueron almacenados a temperatura ambiente hasta el momento de su tinción con hematoxilina y eosina.

2.3.4. Inmunohistoquímica

Las técnicas inmunohistoquímicas empleadas en este estudio abarcan tanto las técnicas de detección basadas en reacción enzimática como es el caso de la peroxidasa, como las técnicas inmunofluorescentes. Los tratamientos de los cortes previos a la incubación con el anticuerpo primario fueron variables dependiendo del anticuerpo y de la técnica de detección. En el caso de los cortes destinados a la detección de BrdU, se les sometió a un tratamiento de 20 minutos con HCl 2 N a 37°C para facilitar la desnaturalización del DNA y permitir el reconocimiento antígeno-anticuerpo. Tras esta incubación, se neutralizó el pH de las muestras con tampón borato 0,1 M a pH 8,5 o PB 0,1 M a pH 7,4 durante 10 minutos. Los cortes de criostato destinados a la observación de SOX2 fueron sometidos por inmersión a un tratamiento de citrato sódico 10 mM a pH 6,5 (previamente precalentado a 100°C) en el que se hirvieron 6 veces durante 10 segundos en un microondas, se dejaron enfriar a temperatura ambiente 20 minutos y se lavaron 3 veces durante 10 minutos con PB 0,1 M.

Con el fin de evitar las uniones de los anticuerpos a antígenos inespecíficos, se incubó el tejido durante 1 hora a temperatura ambiente en un tampón de bloqueo (suero bovino fetal (PAN Biotech GmbH, 3302) al 10 % (v/v) en PB 0,1 M con Triton X-100 (Sigma, 93443) al 0,2 % (v/v)). Para la detección algunos antígenos tales como Ki67, DCX, Calretinina o S100β, se incrementó la concentración de Triton X-100 hasta el 0,5 % (v/v).

La incubación con los anticuerpos primarios se llevó a cabo en una cámara húmeda para cortes procesados en criostato y en flotación para cortes de vibratomo. En ambos casos, los anticuerpos se diluyeron en tampón bloqueo a la concentración de uso correspondiente (Tabla M1) durante toda la noche a temperatura ambiente. Los cortes de vibratomo se incubaron en agitación.

Tras la incubación con los anticuerpos primarios, los cortes se lavaron con PB 0,1 M y se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados al fluoróforo correspondiente, diluidos en tampón bloqueo a su concentración de uso (Tabla M2) durante una hora a temperatura ambiente y en oscuridad. En los casos en los que la detección del antígeno generaba una señal débil y en aquellos tejidos donde la detección se realizó por reacción enzimática, se empleó el método de revelado en triple capa, para lo cual las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado (diluido en tampón bloqueo a 1:200)

durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras esta incubación, los tejidos destinados a inmunofluorescencia, se lavaron 3 veces con PB 0,1 M. En el caso de los cortes que generaban señal débil, se incubaron con estreptoavidina conjugada a un fluoróforo (diluida en tampón bloqueo a 1:100) en condiciones de oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente. Por último, se tiñeron los núcleos con 4'-6-Diamindino-2-phenylindole dihydrochloride hydrate (DAPI Sigma, D9542) 1 µg/ml durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

En el caso de los marcajes por reacción enzimática, los cortes se sometieron a un tratamiento de metanol y H₂O₂ (Roth 8070-2) en proporción 1:7 durante 20 minutos para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena y evitar falsos positivos. Tras lavar el tejido, se incubó con el complejo Avidina-Biotina-peroxidasa (ABC Vector, Vectastain Elite PK6100) durante 30 minutos y posteriormente, tras varios lavados en PB 0,1 M, los cortes se incubaron con diaminobenzidina (DAB) (Sigma, D5637) al 0,02 % (p/v) y H₂O₂ al 0,01 % (v/v) en PB 0,1 M a pH 7,4, hasta que se observó el marcaje deseado.

Tanto las inmunohistoquímicas por reacción enzimática, como las inmunofluorescencias de cortes de criostato y vibratomo, se montaron en Mowiol (Polysciences, 17951) al 50 % con Dabco (Sigma, D2522) al 2,5 % (v/v).

2.3.5. Reacción histoquímica de la β-galactosidasa asociada a la senescencia

La senescencia de la región hipocampal se determinó mediante un ensayo de actividad β-galactosidasa asociada a senescencia celular (Dimri et al., 1995). Para ello, se incubó el tejido durante toda la noche en solución de reacción recién preparada (ácido cítrico a 20 mM; Na₂HPO₄ a 70 mM; NaCl a 40 mM; MgCl₂ a 3 mM; ferrocianuro potásico a 12 mM; ferricianuro potásico a 12 mM) conteniendo 5 mg/ml del sustrato X-gal (Amersham Pharmacia), a un pH de 6. Posteriormente se lavaron los cortes de tejido con PB 0,1 M y se montaron con Mowiol con Dabco al 2,5 % (v/v). Las células senescentes (verde-azuladas) se identificaron mediante microscopía óptica.

2.3.6. Tinción de Hematoxilina y Eosina

Los análisis de anatomía patológica se llevaron a cabo a través de esta tinción. Para ello, se procedió a un protocolo de desparafinado del tejido mediante 3 inmersiones consecutivas en xilol, seguidas de otras 2 en alcohol 100 %, 2 en alcohol 95 %, una en alcohol del 70 % y finalmente agua destilada. Todas las inmersiones fueron de 5 minutos. Posteriormente se procedió a la tinción, sumergiendo los tejidos en Hematoxilina de Harris 2 minutos y lavando en agua. El siguiente paso fue una inmersión rápida en carbonato de litio y posteriormente se lavó el tejido, tras este paso, se dejó 20 segundos en Eosina para finalmente lavarlo y deshidratarlo con concentraciones crecientes de alcohol y xilol. El estudio detallado de las patologías tisulares se llevó a cabo por la Unidad de Veterinaria del Instituto de Salud Carlos III.

2.3.7. Análisis inmunohistoquímico

A. Obtención de imágenes:

Las imágenes de los marcajes con DAB o β -galactosidasa se adquirieron empleando un microscopio óptico (Nikon Eclipse 50i H550S, objetivo de 40X)

Las imágenes de las inmunofluorescencias fueron realizadas con un microscopio confocal (Leica Spectral SP5) empleando el modo mapeo en el que a través de varias imágenes solapadas, se fotografió todo el área ocupada por la SVZ o el HC permitiéndonos realizar recuentos de toda la región de interés presente en un corte. La captura de Z en las imágenes para cortes histológicos se realizó cada 2-4 μm a resolución variable empleando 512 x 512 px para recuentos y 1024 x 1024 px para detalles y con el objetivo 40X en todos los casos. Así se obtuvieron apilados de Z de entre 7-10 planos para recuentos y de entre 15-20 planos para detalles. De forma excepcional, las determinaciones de área ocupada llevadas a cabo para las inmunofluorescencias de GFAP y S100 β , se llevaron a cabo mediante análisis de la intensidad de señal en el programa ImageJ sobre imágenes de microscopia de fluorescencia captadas con el microscopio Zeiss Axio Imager A1 con el objetivo de 40X.

B. Estereología

Tanto en el caso de los recuentos de células BrdU⁺ en la SVZ como en el caso de todos los análisis realizados en el HC, en cada recuento celular se emplearon 5 cortes consecutivos de una misma serie. De este modo, en el caso de los cortes generados con criostato (correspondientes a la SVZ) se analizó un corte cada 300 μm cubriendo un total de 1500 μm . En el caso del HC, dado que los cortes tenían 40 μm de grosor, se analizó un corte cada 320 μm , cubriendo un total de 1600 μm . Para seleccionar esos 5 cortes de cada serie, se establecieron criterios estructurales que nos permitiesen hacer un estudio comparativo entre animales. Para la SVZ, el área de análisis se definió rostralmente por el límite anterior del cruce del Cuerpo Calloso (Ferron et al., 2007). Así los 5 cortes analizados en la SVZ tienen unas coordenadas antero-posteriores desde Bregma aproximadas de 1,1 mm, 0,8 mm, 0,5 mm, 0,2 mm y 0,1 mm (Paxinos y Franklin, 2004). En el caso del HC, el área de análisis comenzó con la aparición del brazo infrapiramidal o brazo ventral del giro dentado del HC presentando los 5 cortes analizados unas coordenadas antero-posteriores aproximadas desde Bregma de -1,2 mm, -1,6 mm, -2 mm, -2,4 mm y -2,8 mm. Para la determinación del número de células BrdU⁺ por estructura, se llevó a cabo el sumatorio de los valores obtenidos de los 5 cortes analizados y se normalizó por el número de series obtenidas (10 en el caso de la SVZ y 8 en el caso del HC).

Los recuentos y medidas realizados sobre el OB se realizaron sobre un único corte cuya coordenada con respecto al Bregma estaba entorno a 3,86 mm. Los recuentos de células GFAP⁺/SOX2⁺ así como las

células GFAP⁺ SOX2⁺ BrdU⁺ en la SVZ se realizaron sobre un único corte por animal correspondiente al corte situado entorno a 0,8 mm de distancia al Bregma.

Los recuentos de las diferentes poblaciones marcadas se realizaron con el soporte del programa LAS AF Lite de Leica. La estereología empleada para los recuentos, varió en función de la distribución homogénea o heterogénea de las poblaciones celulares en las estructuras de interés. Para las poblaciones de distribución heterogénea (Noori y Fornal, 2011) como es el caso de marcajes como BrdU⁺, GFAP⁺ SOX2⁺ (NSCs radiales), DCX⁺ (neuroblastos y neuronas inmaduras) o NEUN⁺ BrdU⁺ se realizó el recuento de todas las células positivas de toda la estructura en cada uno de los 5 cortes analizados y se normalizó por la longitud de la zona estudiada en cada corte (SVZ o SGZ según el caso) y el grosor de dichos cortes (30 µm en cortes de criostato y 40 µm en cortes de vibratomo). Así, se obtuvo la densidad de células positivas para cada marcador en las zonas donde se llevaron a cabo los recuentos.

El análisis empleado para las poblaciones de distribución homogénea como es el caso de SOX2⁺ en la SGZ se efectuó mediante un método similar al disector físico desarrollado previamente (Pakkenberg y Gundersen, 1988). En este caso, se empleó un disector de 100 µm x 100 µm situado en el brazo suprapiramidal del dg y se mantuvo su posición en cada uno de los cortes analizados. Se contaron las células positivas presentes en el disector analizando cada Z de la imagen de confocal de forma individual para evitar el doble marcaje de células presentes en varios planos. De igual forma que para las poblaciones heterogéneas, este dato se normalizó con la longitud y grosor de la región analizada obteniendo la densidad de células positivas en la zona de interés.

3. Métodos *in vitro*

3.1. Extracción de tejido de la SVZ, CA1 y DG.

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y tras la extracción de los cerebros, estos se pusieron en PBS (tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4 y NaCl 137 mM) estéril y frío. En primer lugar, se realizó un corte sagital a lo largo de la cisura sagital para separar ambos hemisferios. A continuación, se procedió a realizar un corte coronal en coordenadas aproximadas de Bregma entre -0,8 mm y -0,9 mm para separar la SVZ del HC (Figura M3 A y B, corte 1). Seguidamente, para el aislamiento de todas las regiones, se empleó una lupa de disección (Leica S6E) y material quirúrgico de Fine Science Tools. La SVZ se diseccionó según lo descrito por Ferrón et al 2007 (Figura M3 A) mientras que el HC se separó en la región CA1 y DG según el protocolo establecido (Babu et al., 2007) que permite aislarlas a través de la fisura hipocampal (Figura M3 B).

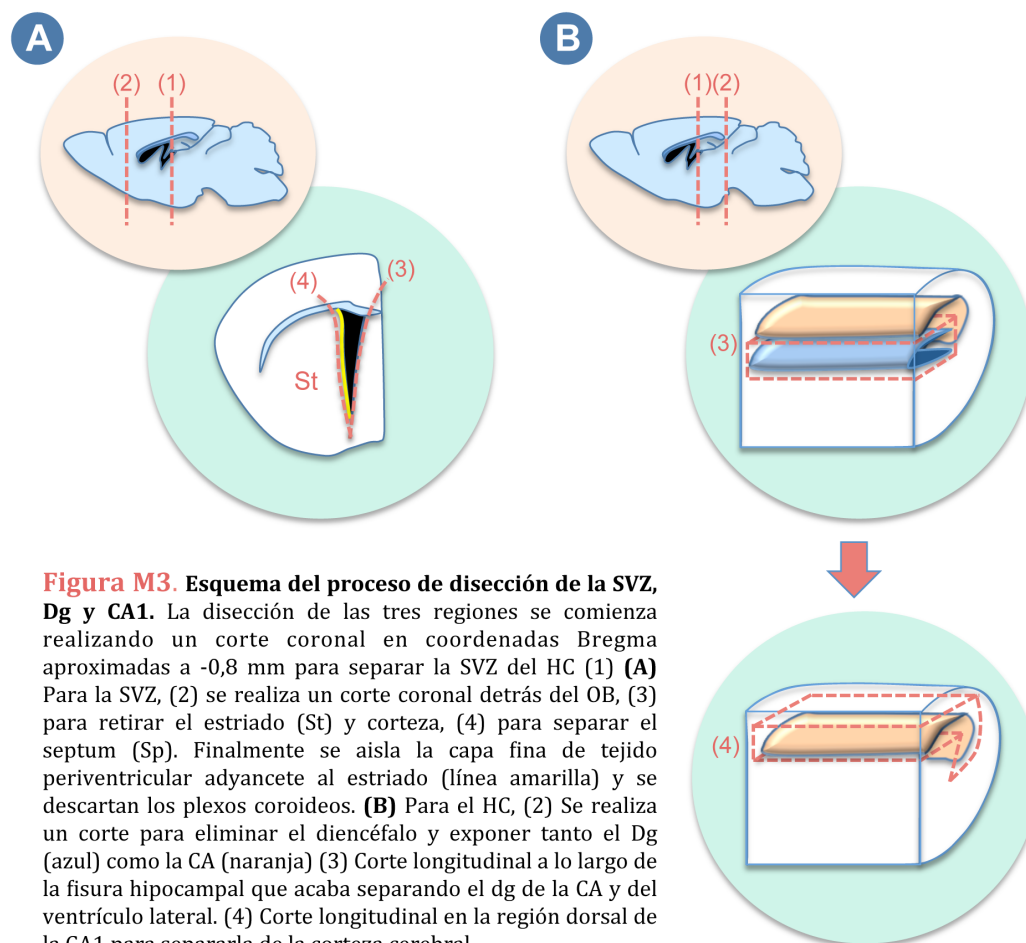


Figura M3. Esquema del proceso de disección de la SVZ, Dg y CA1. La disección de las tres regiones se comienza realizando un corte coronal en coordenadas Bregma aproximadas a -0,8 mm para separar la SVZ del HC (1) **(A)** Para la SVZ, (2) se realiza un corte coronal detrás del OB, (3) para retirar el estriado (St) y corteza, (4) para separar el septum (Sp). Finalmente se aísla la capa fina de tejido periventricular adyacente al estriado (línea amarilla) y se descartan los plexos coroideos. **(B)** Para el HC, (2) Se realiza un corte para eliminar el diencéfalo y exponer tanto el Dg (azul) como la CA (naranja) (3) Corte longitudinal a lo largo de la fisura hipocampal que acaba separando el dg de la CA y del ventrículo lateral. (4) Corte longitudinal en la región dorsal de la CA1 para separarla de la corteza cerebral.

3.2. Cultivo de NSCs de la SVZ adulta

3.2.1. Aislamiento de SVZ-NSCs de ratón

Se diseccionó la SVZ como indica el apartado 3.1 (Figura M2 A) y se troceó a su vez en 3-4 partes que se incubaron durante 20 minutos a 37°C en papaína 0,6 mg/ml previamente activada durante 30 minutos a 37°C en medio EBSS (Fischer Scientific, W34944) + L-Cys 0,18 mg/ml (Sigma C6852) + EDTA 0,18 mg/ml (Merck 1084180250). Transcurrido ese tiempo, se añadieron 4 ml de medio DMEM/F12 1:1 (Invitrogen, 11320-074) y se procedió a la disociación mecánica, disgregando el tejido con una pipeta Pasteur con la punta previamente pulida a la llama. Una vez que la suspensión celular fue homogénea, se centrifugaron las células a 200 g durante 10 minutos, se aspiró el medio y se resuspendió el sedimento en 200 µl de medio de NSCs recién preparado y compuesto por: DMEM/F12 1:1 v/v + GlutaMAX (Gibco, 31331) suplementado con glucosa al 0,6 % (Panreac 141341-1211), NaHCO₃ al 0,1 % (Invitrogen, 25080-060), HEPES 5 mM (Gibco, 15630), Albumina de suero bovino 0,4 mg/ml (BSA, AppliChem, EMR086025), putrescina a 9,6 g/ml (Sigma I-9278), progesterona a 6,3 ng/ml (Sigma, P6149), selenito sodico a 5,2 ng/ml (NaSe, Sigma, S9133), insulina humana a 3,6 µg/ml (Sigma I-9278), apo-t-transferrina humana

a 0,1 mg/ml (Sigma T2252), penicilina/estreptomicina a 100 u/ml (Lonza DE17-602E), heparina a 0,72 u/ml (Sigma H3149) y con los factores de crecimiento epidérmico EGF a 20 ng/ml (Peprotech 315-09) y fibroblástico a 10 ng/ml (FGF2, Peprotech 100-18B) (Gritti et al 1996). A continuación se añadió medio hasta completar el volumen a 2 ml y se descartaron posibles agregados haciendo pasar la suspensión celular por un filtro de 0,45 μ m. Finalmente, el homogenado celular de cada animal se repartió en 4 pocillos de 1 cm² y se incubó a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 6 % durante 8-10 días hasta observar la formación de neuroesferas primarias.

3.2.2. Subcultivo: expansión y mantenimiento de los cultivos

Aproximadamente entre 8-10 días después del aislamiento de las NSCs, las neuroesferas primarias fueron disgregadas hasta el estado de célula individual y sembradas de nuevo (pase) para su expansión. Para realizar dicho pase se recogieron las neuroesferas y se centrifugaron durante 5 minutos a 120 \times g. Al sedimento se le añadió 200 μ l de medio con mitógenos y se disgregó mecánicamente utilizando una micropipeta p200 hasta conseguir una suspensión homogénea. Posteriormente se resuspendieron las células en medio suplementado con mitógenos hasta un volumen final de 1 ml. Para el recuento de células viables, se mezclaron 10 μ l de suspensión celular 1:1 con azul tripano (Sigma 0259 GLH) al 0,1 % (v/v) (en NaCl 0,9 %) y se contaron en una cámara de Neubauer. Para la expansión, se sembraron las células a una densidad aproximada de 50 células viables/ μ l de medio de NSCs suplementado con los mitógenos EGF 20 ng/ml y FGF2 10 ng/ml. El pase de los cultivos de neuroesferas secundarias se efectuó cada 5-7 días, cuando el tamaño promedio de las neuroesferas formadas oscilaba entre las 100-150 micras de diámetro.

3.2.3. Criopreservación y descongelación de cultivos de NSCs

Para criopreservar los cultivos de neuroesferas se sembraron 10⁶ células recién disgregadas en placas de 100 mm, y tras 48-72 horas se recogieron por centrifugación. Posteriormente se suspendieron suavemente en medio de NSCs con dimetilsulfoxido (DMSO, Sigma D2650) al 10 % y se transfirieron a criotubos. Finalmente se colocaron en un recipiente con isopropanol (Mr. Froosty Sigma, C1562-1EA) y se congelaron a -80°C durante 24 horas, para permitir un descenso lento de temperatura (de aproximadamente, 1°C/min) para evitar la formación de cristales. Posteriormente, el almacenaje de las células durante largos periodos de tiempo se realizó en tanques de nitrógeno líquido.

En la descongelación de los cultivos de NSCs se incubaron los criotubos en un baño a 37°C aproximadamente durante 1 minuto hasta su descongelación. Rápidamente las neuroesferas se transfirieron a un tubo con 5 ml de medio de NSCs precalentado, se lavaron por centrifugación a 200 \times g

durante 10 minutos y se transfirieron a un frasco de 25 cm² con medio de NSCs recién preparado y suplementado con mitógenos.

3.2.4. Caracterización de los cultivos de NSCs

3.2.4.1. Determinación de la capacidad de autorrenovación de un cultivo mediante ensayos de formación de esferas

Las células disociadas en pase 3 (también llamadas neuroesferas secundarias), fueron sembradas a densidad media (12,5 células/ul en pocillos de 0,3 cm², lo que corresponde a 2500 células en un pocillo de una placa multipocillo de 96) para asegurar que cada neuroesfera formada procediese de una única célula madre inicial. La placa de cultivo se mantuvo inmóvil para evitar agregados de neuroesferas debidos a la manipulación de dicha placa. Después de 7 días, el número de neuroesferas (clones) se contó y se determinó el índice clonogénico del cultivo (índice clonogénico = número de clones/2500 células sembradas).

3.2.4.2 Determinación de la capacidad de proliferación de un cultivo de NSCs

Se llevaron a cabo dos tipos de ensayos:

A. Medida del diámetro de las neuroesferas

Estos ensayos, se llevaron a cabo tanto sobre neuroesferas primarias (a los 8-10 días *in vitro* (div) de su aislamiento) como sobre neuroesferas secundarias (a los 7 div de haber sido sembrado el ensayo de formación de esferas). En ambos casos, las esferas se fotografiaron en un microscopio invertido (ZEISS Axiovert 40 CFL). La captura de imágenes se hizo a un aumento de 10X tomando aproximadamente 10 campos por pocillo. Posteriormente, se midieron los diámetros de las esferas fotografiadas con la ayuda del programa "Image J".

B. Tasa de incorporación de BrdU

En este caso, el análisis de incorporación de BrdU se hizo sobre neuroesferas secundarias crecidas previamente durante 48h a las que se añadió BrdU 5 µM durante 5 minutos y se incubaron las células a 37°C. Posteriormente, las células se adherieron a cubreobjetos pretratados con matrigel (BD 354230) a 0,2 µg/ml (preparado en DMEM:F12 1:1) durante 7-10 minutos a 37°C y se fijaron con PFA al 2 % durante 10 minutos. Tras varios lavados en PB 0,1 M se detectó la BrdU incorporada por inmunocitoquímica. De este modo, se pudo analizar el número de células en fase S de las neuroesferas del cultivo.

3.2.5. Ensayos de proliferación y autorrenovación con medios condicionados

Se sembraron células individuales de animales de 2 meses de las cepas R1 y P8 en pase 3 a densidad de 12,5 células/ μ l en medio NSCs con mitógenos y se dejaron 4 días para obtener el medio condicionado. A continuación, los medios condicionados (R1 y P8) se filtraron con filtros de 0,2 μ m (Corning, 431219) para evitar la presencia de células del cultivo y se les volvió a añadir EGF (20 ng/ml) y FGF2 (10 ng/ml). Seguidamente, se sembraron por triplicado células disgregadas y filtradas de ambas cepas a densidad de 12,5 células/ μ l en pocillos de 0,3 cm² con medio condicionado. Tras 7 div, se contaron las esferas formadas y se tomaron imágenes para el posterior análisis del diámetro.

3.2.6. Ensayos de proliferación y autorrenovación en presencia de anticuerpos contra el péptido Beta Amiloide 1-42 ((A β (1-42))

El bloqueo de la actividad del péptido A β (1-42) se realizó añadiendo a las neuroesferas secundarias de ratón CD1, SAMR1 y SAMP8 el anticuerpo monoclonal 4G8 (Tabla M1) en el momento del pase a una concentración final de 10 ng/ml. Como control se empleó un anticuerpo anti-IgG y anti-BrdU IgG (Tabla M1) a una concentración final de 10 ng/ml. Las células se sembraron a densidad media y las neuroesferas que se formaron, se contaron y fotografiaron 7 días después de su siembra para determinar su diámetro.

3.2.7. Ensayos de proliferación y autorrenovación de neuroesferas en presencia de A β (1-42).

Se realizó un ensayo de formación de neuroesferas secundarias de animales SAMR1 de 2 meses según lo descrito anteriormente y se añadió péptido A β (1-42) sintético de ratón (Bachem, 5966) así como péptido humano con la secuencia reversa A β (42-1) (Bachem, 3976) a concentraciones crecientes desde 0,025 ng/ml hasta 100 ng/ml, en el momento del pase 3 del cultivo. Los péptidos se prepararon según lo descrito en el apartado 4.1. A los 7 div se contó el número de esferas formadas y se midió su diámetro. Las esferas fueron sometidas a un pulso de BrdU para el análisis de la proliferación de las mismas en presencia de 2 ng/ml de A β (1-42) y, tras adherirse a cubreobjetos pretratados con matrigel y fijarse con PFA 2% durante 10 minutos, se procedió a su análisis a través de inmunocitoquímica.

3.2.8. Ensayos de la vía de señalización A β (1-42): bloqueo de PI3K, MEK y detección de P-AKT.

El estudio de la vía de señalización de A β (1-42) en las neuroesferas secundarias de animales SAMR1 de 2 meses se realizó añadiendo a concentraciones de 10 μ M y 20 μ M el inhibidor específico de PI3K, LY294002 (Cell Signalling, 9901) disuelto en DMSO o el inhibidor de MEK, U0126 (Cell signalling, 9903) a 10 μ M. Estos inhibidores, se añadieron a las células SAMR1 en el momento del pase en presencia y

ausencia de A β (1-42) a una concentración de 2 ng/ml. Tras 7 div, las neuroesferas resultantes se contaron y fotografiaron para determinar su diámetro

La medida de P-AKT en neuroesferas SAMR1 de 2 meses, se llevó a cabo recogiendo y lavando neuroesferas en pase 3 para eliminar la presencia de mitógenos. Posteriormente, dichas neuroesferas se mantuvieron en medio NSC pero en ausencia de mitógenos durante 16 horas. Tras esto, las neuroesferas se estimularon con 2 ng/mL del péptido sintético A β (1-42) durante 30 minutos. Posteriormente, las células se adhirieron a cubreobjetos pretratados con matrigel y se fijaron con PFA al 2 % durante 10 minutos. Se procedió a la detección de P-AKT mediante inmunocitoquímica del residuo fosforilado Thr308 (Tabla M1) y posterior análisis a través de la captura de imágenes en el microscopio confocal en las que se mantuvieron constantes los ajustes establecidos para las neuroesferas control, de forma que ambas condiciones pudiesen ser contrastadas. Finalmente, se analizó el porcentaje de área ocupada por la señal correspondiente a P-AKT en relación al tamaño de la neuroesfera. Este análisis se realizó con ayuda del programa Photoshop CS5.

3.2.9 Técnicas inmunocitoquímicas

En todos los casos, las células se fijaron con PFA al 2% en PB 0,1 M durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron 3 veces con PB 0,1 M y, en el caso de los pulsos con BrdU, se sometió a las células a desnaturalización de la cromatina con HCl 2N durante 10 minutos a 37°C. Tras los lavados, las células se incubaron 20 minutos en solución de bloqueo que contenía PB 0,1 M con FBS al 10 % y Triton X-100 al 0,2 %.

La incubación con los anticuerpos primarios se realizó en tampón bloqueo a 4°C durante toda la noche (Tabla M1). Al día siguiente, tras lavar las células, se incubaron con los anticuerpos secundarios fluorescentes (Tabla M2) en tampón bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, se empleó el fluoróforo DAPI y se montaron los cristales donde estaban adheridas las células sobre un portaobjetos con medio de montaje Mowiol con Dabco al 2,5 % (v/v).

3.2.10 Análisis Inmunocitoquímico

Las imágenes de las inmunofluorescencias fueron realizadas con un microscopio confocal (Leica Spectral SP5) y se tomaron en Z cada 0,5 μ m a resolución 1024 x 1024 objetivo 63X Zoom 2 obteniendo aproximadamente 20 planos para formar el apilado en Z. Los recuentos y medidas de porcentaje de área ocupada por señal, se realizaron con el soporte del programa LAS AF Lite de Leica y con el programa Photoshop CS5 respectivamente.

3.3. Ensayos con células HC7

3.3.1. Mantenimiento de la línea HC7

Las células HC7 fueron aisladas a partir del hipocampo adulto de ratas Fisher 344 adultas. Fueron cedidas por el laboratorio de Fred H. Gage (The Salk Institute for biological Studies, California). Las características de multipotencialidad y autorrenovación de esta línea celular han sido descritas en estudios previos (Gage et al., 1995; Palmer et al., 1995; Palmer et al., 1997).

La expansión de esta línea celular se llevó a cabo en medio de cultivo N2 compuesto por DMEM/F-12 (1:1), suplemento N2 (Gibco) y FGF2. Las células fueron sembradas en placas de cultivo P100, previamente tratadas con poli-L-ornitina y laminina (O/L) (Sigma-Aldrich, P4957 y Millipore, AG56P respectivamente) y mantenidas a 37°C con 5% de CO₂ y ambiente saturado de humedad. Brevemente, el tratamiento aplicado a las placas fue: Poli-L-ornitina 10 µg/ml en H₂O durante toda la noche a temperatura ambiente. Seguidamente se realizaron 2 lavados con H₂O y se trató con laminina 5 µg/ml en PBS durante toda la noche a 37°C. Tras dos lavados con PBS, se guardaron las placas a -20°C hasta su uso.

Al alcanzar la confluencia, las células se recuperaron mediante tripsinización (tripsina 0.5 % y EDTA 0.2 %) y posterior inactivación de la tripsina mediante la adición de 5 ml de medio N2. A continuación, la suspensión celular se recogió y se centrifugó a 200 g, durante 2 minutos estimándose el número de células viables. Las células se sembraron en una nueva placa con medio N2 y FGF2 (20 ng/ml) a una densidad de 1.5×10^6 células por placa P100.

3.3.2. Ensayos de diferenciación de células HC7

Los ensayos de diferenciación en presencia de células HC7, se llevaron a cabo mediante la siembra de 50000 células HC7 por pocillo de placa MW24 (100 células/µl) sobre cubreobjetos tratados según lo descrito anteriormente con poli-L-ornitina/laminina. En el momento de la siembra, sobre el mismo medio de mantenimiento pero en ausencia de FGF2, se les añadió BMP6 (Peprotech, 120-06) a una concentración de 50 ng/ml. Tras 4 días in vitro, las células se fijaron con PFA 2 % durante 10 minutos y se procedió a la inmunocitoquímica según el procedimiento descrito anteriormente a excepción de su tratamiento con HCl 2 N.

4. Inmunodetección de proteínas y péptidos

4.1. Preparación de los péptidos sintéticos Aβ (1-42) y Aβ (42-1)

Los péptidos sintéticos Aβ (1-42) de ratón y el péptido reverso Aβ (42-1) de humano se disolvieron en tubos de polipropileno en 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) a una concentración de 1 mM. La solución que contenía el péptido disuelto fue alicuotada igualmente en tubos de polipropileno y se

mantuvo toda la noche a temperatura ambiente en una cabina de extracción de gases para permitir la evaporación del HFIP según lo descrito en Stine et al., 2011. Los tubos que contenían el péptido sintético A β (1-42) fueron congelados a -80°C al día siguiente preservando así el estado monomérico soluble del péptido. Previo a su utilización, los péptidos se equilibraron a la temperatura ambiente y se resuspendieron a una concentración de 442 mg/ml (100 mM) en 55 mM de NaHCO₃, pH 9 y 3 mg/ml de BSA para su análisis mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con Sodio Dodecil Sulfato (SDS-PAGE) o a una concentración de 200 ng/ml (45,3 nM) en el mismo tampón para el tratamiento de NSCs en cultivo.

4.2. Extracción de la proteína total

Para la extracción de la proteína total de los DG de animales R1 y P8, estos se disgregaron con ayuda de una micropipeta p200 así como de agujas BD 1 mL 25GA en tampón de lisis TNE (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 137 mM, EDTA 2 mM, Triton X-100 al 0,2 %) suplementado con una mezcla comercial de inhibidores de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail Roche, 11873580001) así como con los inhibidores de fosfatasa ortovanadato (1 μ M) y NaF (10 μ M). Los lisados resultantes se incubaron durante 10 minutos en hielo y cada 10 minutos se agitaron en un vortex. A continuación se centrifugaron a 4°C durante 15 minutos a 2.800 g, y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio. En los casos en los que el lisado no se utilizó inmediatamente, se congeló en nieve carbonica y se guardo a -80°C.

4.3. Cuantificación de la proteína total

Para la cuantificación de proteína total de los extractos de tejido se recurrió al método BCA (ácido bicinonínico), método colorimétrico que se caracteriza por ser muy sensible y con una posibilidad de interferencias muy reducida. El método esta basado en la reducción de Cu²⁺ a Cu¹⁺ en un medio alcalino (reacción de biuret) para dar lugar a un compuesto de color purpura con un máximo de absorbancia a 562 nm (A562). La curva patrón se preparó a partir de diluciones seriadas de BSA y de un reactivo de trabajo compuesto por las soluciones A+B en proporción 50:1 respectivamente (BCATM Protein Assay Kit Thermo Scientific, JPG125020), donde A es la solución sustrato que contiene el ácido bicinonínico y B contiene sulfato de cobre. En una placa multipocillo se pusieron tres réplicas de cada dilución de la curva patrón así como de las muestras a cuantificar, y junto al reactivo de trabajo se incubaron durante 30 minutos a 37°C. La lectura de las muestras se llevó a cabo en el lector de placas colorimétrico (Infinite M200, TECAN) a A562.

4.4. Preparación de las muestras para Western Blot

Cuantificada la cantidad de proteína de las muestras, éstas se prepararon para ser resueltas por electroforesis. Para ello se resuspendió la misma cantidad de proteína de todas las muestras en tampón de carga (H_2O destilada, glicerol 50 % (v/v) en Tris-HCl 1 M a pH 6,8, SDS 10 % (p/v), azul de bromofenol 5 % (p/v), y el agente reductor β -mercaptoetanol al 5 % (v/v)). En el caso de los péptidos sintéticos, se empleó el mismo tampón de carga para diluir tanto del péptido sintético de ratón A β (1-42) como del péptido reverso de humano A β (1-42). Las muestras se desnaturalizaron mediante su incubación durante 5 minutos a 96°C.

4.5. Preparación de geles. Electroforesis. Transferencia a membrana

4.5.1. Preparación de geles SDS-PAGE.

La resolución de las proteínas se realizó en geles desnaturalizantes de poli(acrilamida) (SDS-PAGE) y en condiciones reductoras. El pregel de apilamiento se preparó al 5% acrilamida: 0,13 % bisacrilamida (Roth, 3029.1), Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 0,1 %, persulfato amónico (PSA) al 0,1 % y el N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina al 0,1 %. (TEMED, SIGMA, T7024). Por otro lado, el gel separador se preparó al 12 % de acrilamida: 0,32 % bisacrilamida, Tris-HCl 375 mM pH 8,8, y SDS, PSA y TEMED a la misma concentración que el pregel.

La electroforesis se realizó a 100 mA en tampón de electroforesis (Tris-HCl 25mM glicina 0,2 M y SDS al 1 %) y se utilizó un marcador pre-teñido con un rango de peso molecular de 20 kDa a 120 kDa (Fermentas, SM0441). Finalmente, se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, Millipore IPVH00010) previamente activada con metanol 100 %. La electrotransferencia del gel a la membrana se realizó a 80 V durante 2 horas en tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM, pH 8.3, glicina 192 mM y metanol 20 %) y a 4°C.

4.5.2. Preparación de geles SDS-PAGE de alta resolución.

Para la separación de los péptidos, se utilizaron geles que emplean Tris-Tricina como componente del tampón de electroforesis del cátodo y que aportan una mayor resolución para bajos pesos moleculares. El pregel de apilamiento se realizó al 4 % acrilamida-0,13 % bisacrilamida, premezcla (Tris-HCl 0,8 M pH 8,45, SDS 0,08 %), persulfato amónico al 0,15 % (PSA, Sigma A3678) y el N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina al 0,15 % (TEMED, Sigma T7024) y Agua MilliQ hasta completar el volumen requerido. Por otro lado, el gel separador se preparó al 12 % de acrilamida: 0,32 % bisacrilamida, premezcla gel (Tris-HCl 1 M pH 8,45, SDS 0,1 %), glicerol 8 % y PSA y TEMED a la misma concentración que el pregel.

La electroforesis se llevó a cabo a 100 V durante aproximadamente 2 horas empleando como tampón de electroforesis para el ánodo Tris-HCl 148 mM, pH 8,9 y como tampón de electroforesis para el cátodo Tris-HCl 148 mM pH 8,25, Tricina 68 mM, SDS 0.1 %. Se utilizó un marcador de peso molecular (Thermo, PageRuler low range, 26632) con un rango de peso molecular entre 3,4 y 100 KDa. Finalmente, se realizó la transferencia de los péptidos a una membrana de nitrocelulosa (Whatman, BA83). La electrotransferencia del gel a la membrana se realizó a 100 V durante 1 hora en tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM a pH 8,3, glicina 192 mM y metanol 20 %) a 4°C.

4.6. Incubación de las membranas con los anticuerpos

Previamente a la incubación con los anticuerpos, se realizó el bloqueo de los sitios inespecíficos bien con BSA al 3 % (p/v) en tampón Trisborato 20 mM pH 7,6, NaCl 200 mM, Tween 20 (Promega, H515) al 0,1 % (TTBS) durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Realizado el bloqueo de la membrana, esta se incubó con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla M1) diluido en TTBS con 3 % BSA a temperatura ambiente durante toda la noche. Al día siguiente se realizaron al menos tres lavados de 10 minutos con TTBS y se incubó la membrana con el anticuerpo secundario-HRP correspondiente (Tabla M2) durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras varios lavados en TTBS, se realizó un último lavado de 5 minutos en TBS (TTBS sin el detergente Tween 20). Por último, el revelado de las proteínas se hizo mediante quimioluminiscencia con el reactivo ECL (GE Healthcare, RPN 2232SK) y se registró la luminiscencia en una película fotográfica (Agfa Healthcare, RP2 plus).

4.7. Ensayo de inmunoabsorbancia asociado a reacción enzimática (ELISA)

El ensayo de Elisa fue realizado con tejido diseccionado según lo descrito previamente (3.1. Extracción de tejido de SVZ, CA1 y Dg). Este tejido se guardó en tubos de polipropileno para preservar el A β (1-42) presente en la muestra y se congeló inmediatamente después de su extracción en hielo seco. En el momento del análisis, los tejidos fueron disgregados en Cloruro de Guanidinio (Sigma, G4505) a 5 M en Tris HCl 50 mM, pH 8 % para garantizar el estado monomérico soluble del A β (1-42). Parte del extracto de proteína total, se diluyó 1/50 en TNE (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 137 mM, EDTA 2 mM, TritonX-100 al 0,2 %) con la finalidad de evitar la interferencia del Cloruro de Guanidinio con el método de cuantificación de proteína total BCA y poder emplear este dato para la normalización del ensayo de ELISA. Así, se empleó el kit Mouse A β 42 ELISA (Invitrogen, KMB3441) siguiendo las indicaciones del fabricante. De este modo, se analizaron las cantidades de A β (1-42) en estado monomérico de la CA1 de animales SAMR1 y SAMP8 de 2, 6 y 10 meses así como de la SVZ y DG de animales de dichas cepas y de 2 meses de edad.

5. Estudios de expresión génica

5.1. Extracción de RNA total

La extracción de RNA total a partir de neuroesferas SAMR1 y SAMP8 en cultivo, se realizó empleando el kit “RNeasy mini” de Quiagen siguiendo las recomendaciones del fabricante. La extracción de RNA total de tejido de ambas cepas, se llevó a cabo empleando un protocolo de extracción basado en el disolvente orgánico trizol (TriReagent®, Sigma T9424). Se partió del tejido previamente diseccionado y congelado a -80°C (ver apartado 3.1. Extracción de tejido de SVZ, CA1 y DG). Este tejido se descongeló a 4°C y se disgregó primero con una micropipeta p1000, a continuación con una p200 y finalmente con una aguja 25GA 1 ml BD acoplada a una jeringuilla en un volumen de 250 µl de trizol. Una vez que el tejido se disgregó homogéneamente, se dejó 5 minutos a temperatura ambiente para asegurar la disociación completa de los complejos nucleoproteicos. Se añadieron 50 µl de cloroformo y se agitó el tubo, dejando incubar 2 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó a 16000 g en una microfuga (Mikro 200R Hettich) durante 15 minutos a 4°C. Se pasaron 70 µl de la fase acuosa en la que se encuentra el RNA a un nuevo tubo donde se añadieron 125 µl de isopropanol, se agitó y se dejó incubar 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 16000 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante se decantó y el pellet de RNA se lavó con 150 µl de EtOH 70 % frío mediante una centrifugación a máxima velocidad durante 5 minutos a 4°C. Finalmente, se eliminó el EtOH, se dejó secar el pellet hasta que no quedaran restos de EtOH y se resuspendió en 20 µl de H₂O libre de RNAsa. Para eliminar la posible contaminación con DNA de la muestra, se añadió 1 µl de DNAsa y se dejó actuar sobre la muestra durante 30 minutos a 37°C. Para parar la reacción, se añadieron 2 µl de EDTA 0,02 M y se incubaron las muestras a 65°C durante 15 minutos.

En ambos casos, la cantidad de RNA total presente en las muestras se determinó mediante un espectrofotómetro (Infinite M200, TECAN) a través de la medida de absorbancia a 260 nm (A260).

5.2. RT y Q-PCR

El RNA total extraído se retrotranscribió a cDNA (PrimeScript RT reagent Kit Takara, RR037A) y las condiciones empleadas para el desarrollo de la RT fueron: 1 ciclo a 37°C durante 15 minutos seguido de otro ciclo a 85°C de 5 segundos de duración. Posteriormente, se realizó el análisis de los diferentes genes recogidos en la Tabla M3 por PCR cuantitativa (Q-PCR) en placa (Roche 480LC 4729692001) empleando SyBR PremixEX Taq (Takara, RR041A). Las secuencias de los cebadores, fueron obtenidas mediante el análisis de la secuencia del gen en el programa Primer Express 3.0 para obtener temperaturas de fusión entorno a 58°C en todas las parejas de cebadores. Así mismo, los cebadores se diseñaron entre exones para evitar posible amplificación del DNA genómico contaminante en las muestras. Los amplicones obtenidos siempre fueron menores de 150 bp. En todos los casos, se

emplearon las siguientes condiciones de PCR, modificándose en cada caso la temperatura de fusión (T_m) dependiendo del par de cebadores empleado:

(1) desnaturalización durante 1 minuto a 95°C; (2) Amplificación durante 10 segundos a 95°C, 10 segundos a la temperatura de fusión específica de cada cebador y extensión durante 10 segundos a 72°C. Este proceso se repitió 45 ciclos; (3) Curva de disociación de 1 único ciclo durante 15 segundos a 5 grados por encima de la temperatura de fusión de cada cebador, 10 segundos a 95°C, 30 segundos a 40°C y finalmente 4°C mantenidos en el tiempo. Finalmente, los niveles de expresión de RNA mensajero se determinaron por el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

6. Análisis estadístico

Todos los datos obtenidos tanto de los estudios *in vivo* como de los estudios *in vitro*, fueron sometidos a la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar si seguían una distribución normal típica de una población natural. Además, se les aplicó el Test de Levene para evaluar la homogeneidad de varianzas. El análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, se empleó para el análisis estadístico de las diferencias entre edades de la misma cepa de ratón. Se aplicaron test post-hoc (test de Tukey y test de Dunnett) para establecer las grupos significativamente diferentes. Se aplicó el análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías para estudiar la influencia de la edad, la cepa y la interacción de ambas en los análisis longitudinales de R1 y P8. También se aplicó el análisis de t de Student de dos colas, pareada en el caso del análisis estadístico de los efectos de los tratamientos sobre las células y no pareada para el estudio de los animales de diferentes cepas pero de la misma edad. Para los casos de las comparaciones entre valores relativos se utilizó la transformación arcsen (raíz (valor)) previa al análisis por el test estadístico correspondiente en cada caso. Para el análisis estadístico de los porcentajes de supervivencia, se aplicó el test de Mantel-Cox. Los datos se presentan como la media de valores \pm el error estándar de la media. En los experimentos *in vivo* “n” indica el número de ratones independientes empleados por cepa y edad en cada experimento. Un P valor de 0,05 fue considerado estadísticamente significativo (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ (entre cepas de la misma edad o entre células control y tratadas); $^{\Delta} p < 0,05$, $^{\Delta\Delta} p < 0,01$ y $^{\Delta\Delta\Delta} p < 0,001$ (entre SAMR1 de diferentes edades); # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ y ### $p < 0,001$ (entre SAMP8 de diferentes edades).

TABLA M1: Anticuerpos primarios

Anticuerpo primario	Casa comercial	Dilución	Uso
Ratón anti-A β (17-24) 4G8	Covance (4G8;SIG-39330)	1:100/1:1000	ID/WB e IF
Ratón anti- β IIIITub	Covance (MMS435P)	1:300	IF
Ratón anti- β -actina	SIGMA (A-5441)	1:5000	WB
Ratón anti-BMP4	Millipore (MAB1049)	1:500	WB
Ratón anti-BMP6	Millipore (MAB1048)	1:500	WB
Ratón anti-BrdU	DAKO (MO744)	1:25 /1:300	ID/IF
Rata anti-BrdU	Abcam (ab6326)	1:500	IF
Conejo anti-Calretinina	Swant (7699/4)	1:200	IF
Conejo anti-Caspasa	Cell Sig. (Asp175)	1:75	IF
Cabra anti-DCX	Santa Cruz (sc-8066)	1:200	IF
Conejo anti-GFAP	DAKO (Z0034)	1:300	IF
Ratón anti-GFAP	SIGMA (G-3893)	1:300	IF
Ratón anti-IgG	Millipore (12-371)	1:100	ID
Conejo anti-Ki67	Thermo (RM9106SO)	1:200	IF
Ratón anti-Nestina	Abcam (ab11306)	1:100	IF
Ratón anti-NeuN	Chemicon (MAB377)	1:100	IF
Conejo anti-P-AKT Thr (308)	Cell Sig. Tech. (9275)	1:250	IF
Conejo anti-P-SMAD (1/5/8)	Cell Sig. Tech. (9511)	1:500	WB
Ratón anti-S100 β	SIGMA (S2532)	1:250	IF
Conejo anti-SMAD (1/5/8)	Santa Cruz (sc6031R)	1:200	WB
Cabra anti-SOX2	R & D (AF2018)	1:50	IF

ID, inmunodepleción; IF, inmunofluorescencia; WB, western blot

TABLA M2: Anticuerpos secundarios

Anticuerpo secundario	Casa comercial	Dilución	Uso
Alexa 488 burro anti-rata	Invitrogen (A21208)	1:500	IF
Alexa 488 burro anti-ratón	Invitrogen (A21202)	1:500	IF
Alexa 555 burro anti-conejo	Invitrogen (A31572)	1:300	IF
Alexa 647 burro anti-conejo	Invitrogen (A31573)	1:300	IF
Biot. caballo anti-cabra	Vector (BA-9500)	1:200	IF
Biot. caballo anti-conejo	Vector (BA-1100)	1:200	IF
Biot. caballo anti-ratón	Vector (BA-2000)	1:200	IF
Cy3 burro anti-conejo	Jackson (711-165-152)	1:200	IF
Cy3 cabra anti-ratón	Jackson (115-166-062)	1:1000	IF
DyLight 488 burro anti-conejo	Jackson (711-486-152)	1:500	IF
Estreptavidina Cy2	Jackson (016-220-084)	1:100	IF
Estreptavidina Cy3	Jackson (016-160-084)	1:100	IF
Estreptavidina Cy5	Jackson (016-170-084)	1:100	IF
HRP cabra anti-conejo	Jackson (11-035-003)	1:10000	WB
HRP oveja anti-ratón	GE healthcare (RPN4201)	1:50000	WB

IF, inmunofluorescencia; WB, western blot

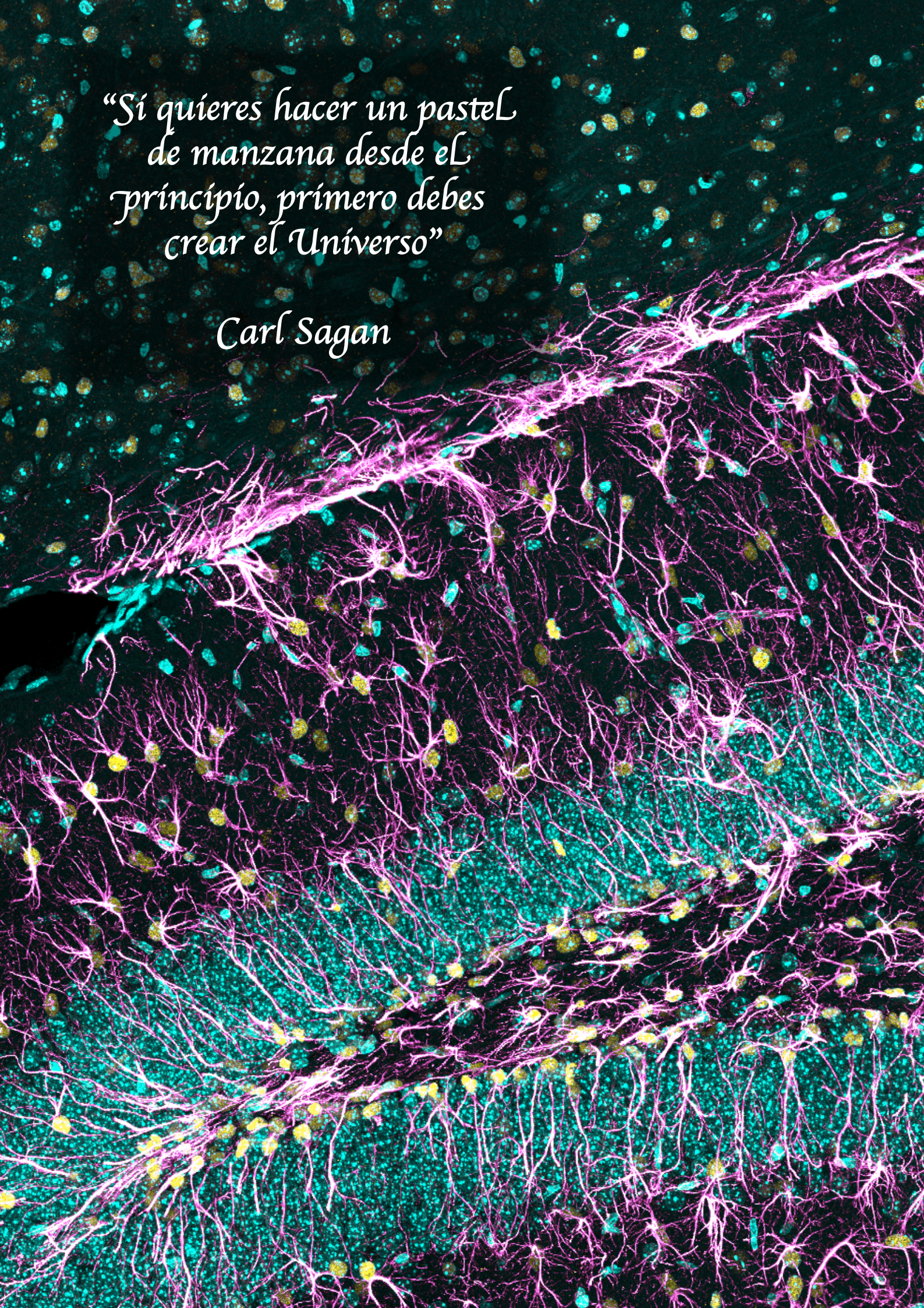
TABLA M3: Cebadores

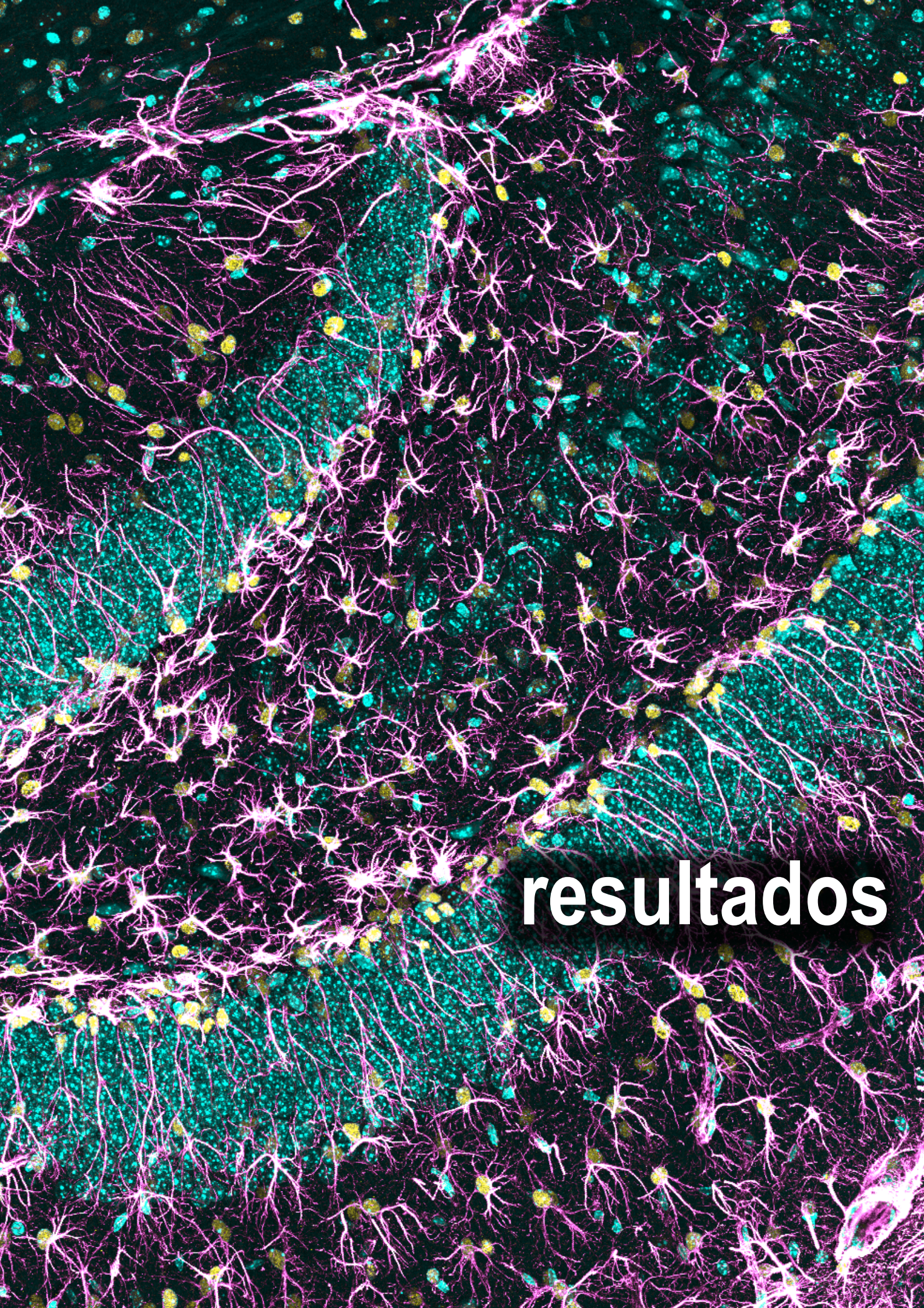
Gen	Secuencia cebadores 5' → 3'
<i>Actb</i>	F-AAGGCCAACCGTGAAAAGATG; R-GTCCATCACAATGCCTGTGGTA
<i>Alk2</i>	F-CTCCGGTCTTCCTTTCTGGT; R-GCTGCCCTCCATACTTCTCC
<i>App</i>	F-GTAAAATGTCTCTGGGTGCTTCTTTC; R-AAACAACAGAGGATGGAAGATTCTT
<i>Bmp2</i>	F-CTTAGACGGACTGCGGTCTCCTA; R-GGGGAAGCAGCAACACTAGAAGA
<i>Bmp3</i>	F-GCTGTGGCTCTATGACAGGTACA ; R-CGTAGAAATACAGTGTGGCTGACA
<i>Bmp4</i>	F-CCTTTCCAGCAAGTTTGTTCAG; R-TTGGCATAATAAACGACCATCAG
<i>Bmp5</i>	F-AGGACTGGATCATAGCACCAGAA; R-AGATGGCATTAGTTTGGTTGGA
<i>Bmp6</i>	F-TGGTGGAGTACGACAAGGAGTTC; R-AGAGTCTCTGTGCTGATGCTCCT
<i>Bmp7</i>	F-CACAACCTGGGCTTACAGCTCT; R-CTTGAAGAAGGCCACCATGAAG
<i>Bmp12</i>	F-ATCACC GGCTTCACAGACCA; R-GGAAGGAGGGTCGCACTGTC
<i>Bmp13</i>	F-CAATGCCAGCTTTTTCCAGTCT ; R-AGAGGAGTGTGCGAGAGATCGT
<i>Bmpr1a</i>	F-GAACAGGATGAAGCATTATTCCAGT; R-CATCTGAATCTGTTTGGCAATAGTTC
<i>Bmpr1b</i>	F-GAACATTCTGGGGTTCATTGC; R-CTTGGCATCTAAGGTGGTGGGA
<i>Bmpr2</i>	F-GAGTGCCTTTGATGGAACATGAC; R-GCAAGAGCTTACCCAATCACTTGT
<i>Chrd</i>	F-GGGCTGCTATTTTGATGGTGA; R-ACTGCACCTTCTCACAGTGCA
<i>Ccnd1</i>	F-CGTGGCCTCTAAGATGAAGGAG; R-TGGCATTTTGGAGAGGAAGTGT
<i>Fst</i>	F-GCCTCCTGCTGCTGCTACTCT; R-CTGCAACACTCTTCCTTGCTCA
<i>Gdf10</i>	F-CAGGAGGTACCTGAAGGTGGAT; R-AAGGACTCCAAGGGAGTTCATCT
<i>Noggin</i>	F-TGTGGTCACAGACCTTCTGC; R-GTGAGGTGCACAGACTTGGA
<i>Psen1</i>	F-CAAGAGCTGCTGTCCAGGAACT; R-CAGGCTATGGTTGTGTTCCAGTC
<i>Sdha</i>	F-AGAGGACAACTGGAGATGGCATT; R-AACTTGAGGCTCTGTCCACCAA
<i>Tgfb1</i>	F-AGCCTGGACACACAGTACAGCA; R-ATGTTGGACAACTGCTCCACCT
<i>Tgfb2</i>	F-GAGGAGTACTACGCCAAGGAGGT; R-GGACGATTCTGAAGTAGGGTCTGT
<i>Tgfb3</i>	F-AGATCCATAAATTCGACATGATCCA; R-ATTGGTTCCATTTTCTCCACTGA

F, cebador directo; R, cebador reverso

*“Si quieres hacer un pastel
de manzana desde el
principio, primero debes
crear el Universo”*

Carl Sagan





resultados

CAPÍTULO 1

Caracterización anatomopatológica de la cepa de ratón SAMP8 frente a su cepa control SAMR1

El objetivo de este primer estudio fue establecer la edad de aparición tanto de alteraciones relacionadas con el envejecimiento normal como de las relacionadas con el envejecimiento patológico (EA) en los machos P8 objeto de nuestro posterior estudio. Para ello, se llevó a cabo un análisis anatomopatológico de diferentes órganos de animales R1 y P8 de distintas edades así como un análisis concreto de algunas de las características fundamentales de la EA en los ratones P8 a distintas edades, que se comparó con el de los ratones R1.

1.1. Análisis macroscópico y anatomopatológico: La cepa P8 presenta características de senescencia acelerada a partir de los 6 meses de edad

Las diferencias en el análisis macroscópico de ambas cepas comienzan a una edad media de 6 meses, cuando los animales de la cepa P8 presentan una pérdida sustancial de actividad física y de pelaje, además de sufrir en grado variable lordocifosis en la columna vertebral (Figura R1 A). La aparición de estas alteraciones coincide en el tiempo con el inicio de la pérdida progresiva de peso en la cepa P8, como se describió en 1981 por el grupo del Prof. Takeda (Takeda et al., 1981) (Figura R1 B). Además, con el objetivo de estimar la supervivencia de ambas cepas de ratón se realizó una curva de Kaplan-Meier. Se observó una menor supervivencia de los animales P8 a edades tempranas y medias de entre 5 y 8 meses y una caída drástica de la supervivencia en los animales P8 a partir de aproximadamente los 8 meses de edad en comparación con los animales R1 (Figura R1 C).

En cuanto al análisis anatomopatológico, se observó cómo a edades tempranas (2 meses), la cepa R1 presentaba infiltrados linfocíticos en el pulmón mientras que la cepa P8 presentaba dichos infiltrados en un número mayor de órganos tales como la glándula submaxilar, el pulmón y el estómago. A partir de edades intermedias (6 meses), tanto los animales R1 como los P8 presentaron características asociadas

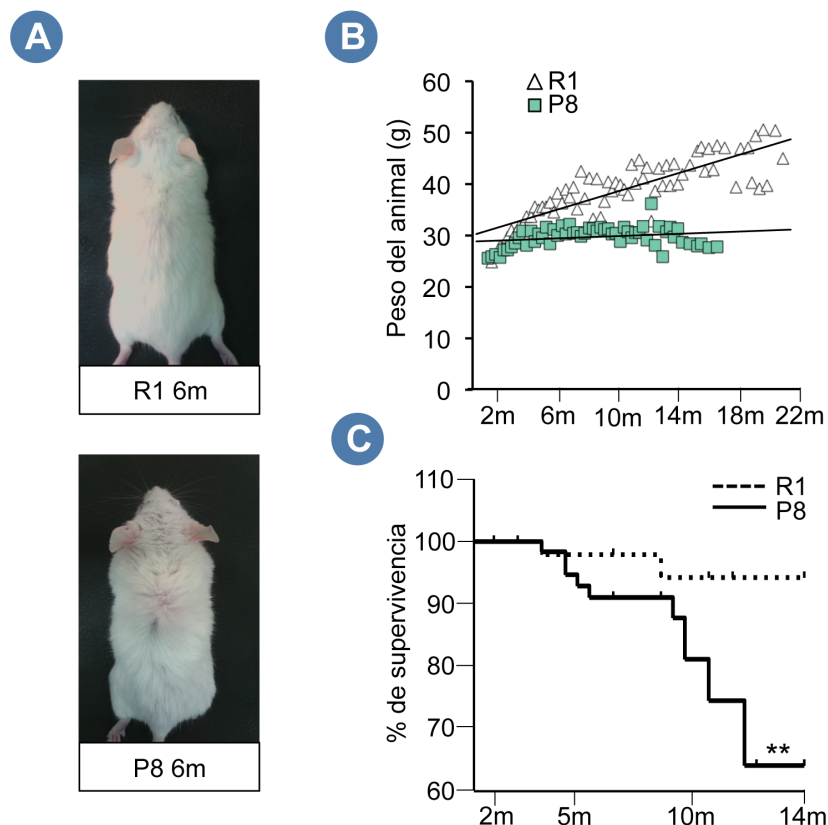


Figura R1. Los animales P8 comienzan a mostrar alteraciones asociadas al envejecimiento a los 6 meses de edad. **(A)** Fotografías representativas del estado físico de los animales P8 frente a los animales R1 a los 6 meses de edad. **(B)** Líneas de tendencia del peso corporal total de los animales R1 y P8 a lo largo de su vida. Los machos R1 presentan un incremento de peso a lo largo de su vida, mientras que los P8 incrementan su peso a edades tempranas pero se estabilizan entorno a los 6 meses. **(C)** Curva de Kaplan-Meier de la supervivencia de los animales R1 y P8. Los animales P8 presentan una menor esperanza de vida en comparación con los R1 (** p < 0,01). Los datos se muestran como la media \pm E.E.M.

al envejecimiento en órganos como el estómago o el hígado en el caso de los R1 y el hígado y las glándulas prepuciales en el caso de los P8 (Tabla R1). El grado de afectación de los animales P8 a esta edad fue mayor que el de los R1. A los 10 y 14 meses de edad, la mayor parte de los animales P8 presentaba alteraciones tanto relacionadas con el envejecimiento como con infiltrados linfocíticos. Sin embargo, los animales R1 presentaban una tasa de afectación mucho menor, lo que da a entender las mejores condiciones de salud presentadas por los animales R1 a edades avanzadas frente a los animales P8.

TABLA R1: Análisis anatomopatológico de las cepas R1 y P8 a 2, 6, 10 y 14 meses de edad.

SAMR1	2m	6m	10m	14m	Patología
Glándula submaxilar		(1/8)	(2/2)		Infiltrados linfocíticos
Riñones		(2/8)	(2/2)		
Páncreas			(2/2)		
Pulmón	(5/5) (5/5)	(4/8) (4/8)	(1/2)		Infiltrados linfocíticos Hiperplasia alveolar
Hígado		(7/8)	(2/2)	(2/2)	Lipidosis hepática (envejecimiento)
Estómago	(1/4)	(2/8)			Quistes (envejecimiento)

SAMP8	2m	6m	10m	14m	Patología
Glándula de Harder		(3/6)	(1/2)	(1/1)	Infiltrados linfocíticos
Glándula submaxilar	(1/2)	(5/6)	(2/2)	(1/1)	
Próstata		(2/6)	(1/2)		
Glándula Coagulante (Próstata anterior)		(2/6)			
Vejiga		(5/6)	(1/2)	(1/1)	
Estómago	(1/2)	(4/6)	(2/2)	(1/1)	
Riñones		(5/6)	(2/2)	(1/1)	
Páncreas		(1/6)	(2/2)		
Pulmón	(3/3) (3/3)	(5/6) (3/6)	(2/2)	(1/1)	Infiltrados linfocíticos Hiperplasia alveolar
Hígado	(1/3)	(5/6)	(2/2)	(1/1)	Lipidosis hepática (envejecimiento)
Glándula prepucial		(5/5)	(2/2)		Abcesos (envejecimiento)
Bazo			(2/2)		Hiperplasia mieloide (en respuesta a infecciones)

1.2. Análisis de la patología cerebral asociada a la EA: La cepa P8 muestra la aparición de los primeros síntomas a los 6 meses de edad

Una de las zonas más sensibles y de primera afectación en la Enfermedad de Alzheimer en el cerebro humano es el hipocampo y más concretamente la región cornu ammonis 1 (CA1), que resulta afectada con la presencia de placas formadas por agregados del péptido A β (1-42). Es por ello que se determinó por ELISA la cantidad total de A β (1-42) de la región CA1 de animales P8 y R1 de 2, 6 y 10 meses de edad. Según se muestra en la figura R2 A, los animales P8 muestran un incremento significativo de la cantidad

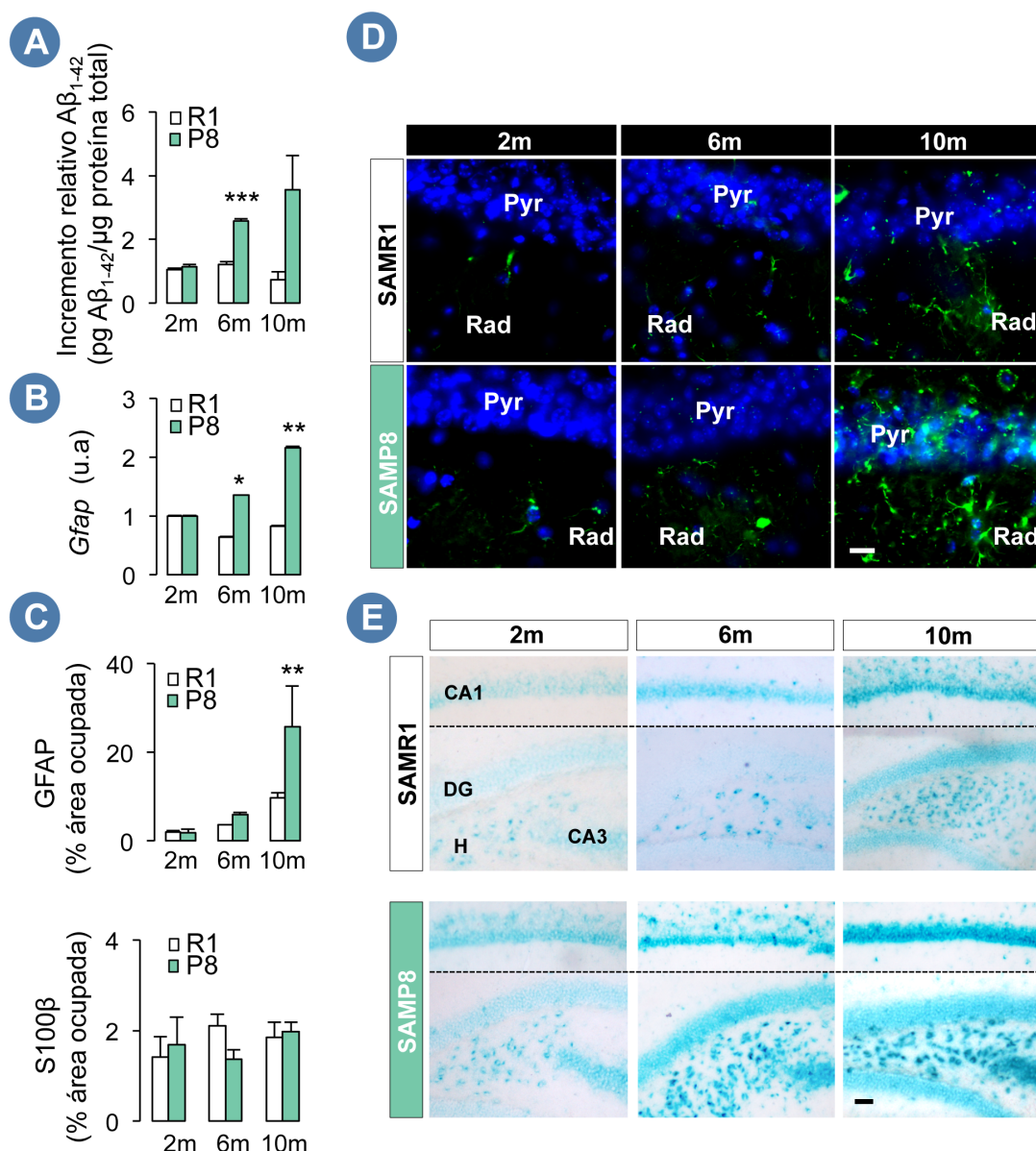


Figura R2. Los animales P8 comienzan a mostrar patologías características de la EA en el hipocampo a los 6 meses de edad. (A) Determinación de la concentración relativa de $A\beta$ (1-42) en la región CA1 de animales R1 y P8 de 2, 6 y 10 meses mediante ELISA. Los animales P8 presentan un incremento significativo en la presencia del péptido a los 6 meses de edad comparado con los 2 meses (***) $p < 0,001$ (B) Expresión promedio del gen *Gfap* en animales R1 y P8 a distintas edades analizado mediante RT-qPCR y expresado en unidades arbitrarias relativas (u.a.). Los animales P8 muestran un incremento en la expresión de mRNA de dicho gen a los 6 y 10 meses de edad (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, respectivamente) en comparación con la cepa R1. (C) Análisis inmunohistoquímico del área ocupada por GFAP y S100β en la región CA1 de animales R1 y P8 de distintas edades. Los animales P8 muestran un incremento en la presencia de GFAP que comienza a los 6 meses de edad y es significativo a los 10 meses en comparación con los R1 (** $p < 0,01$). Los niveles de S100β no muestran cambios significativos entre cepas a ninguna edad. (D) Inmunofluorescencia representativa de GFAP en la CA1 de los animales R1 y P8 de 2, 6 y 10 meses de edad. (E) Imágenes representativas de animales R1 y P8 de diversas edades, de la tinción para β-Galactosidasa asociada a la senescencia. Los datos se muestran como la media \pm E.E.M. $n \geq 4$. Abreviaturas. CA1, cornu ammonis 1; Pyr, capa piramidal; Rad, estrato radiatum; H, hilus; DG, giro dentado; CA3, cornu ammonis 3. Barra calibradora D y E, 10 μ m y 50 μ m respectivamente.

de A β (1-42) comparado con los animales control R1 a los 6 meses de edad. Sin embargo, no se observó la formación de placas amiloides mediante inmunofluorescencia con el anticuerpo 4G8 (no mostrado). Adicionalmente, como medida de la gliosis reactiva característica de la enfermedad, se analizó la expresión de la proteína ácida glial fibrilar (GFAP) tanto a nivel de expresión de mRNA como a nivel de proteína. Los resultados mostraron una sobreexpresión del gen *Gfap* (Figura R2 B) y un incremento progresivo de la inmunoreactividad de GFAP (Figura R2 C y D) en la CA1 de animales P8 de 6 meses en comparación con animales R1 de la misma edad. Para determinar si el aumento incremento en la inmunoreactividad de la proteína GFAP podría explicarse por un aumento en el número de astrocitos, se analizó por inmunofluorescencia el marcador de astroglia madura S100 β . No se encontraron diferencias significativas ni entre las cepas R1 y P8, ni entre las diferentes edades de las mismas (Figura R2 C), como ya se había demostrado previamente (Wu et al., 2005).

Adicionalmente, se llevó a cabo un estudio de senescencia, mediante la tinción de β -Galactosidasa asociada a este proceso (SA- β -Gal) . Se observó un incremento gradual de la misma tanto en los animales R1 como en los P8 con la edad, si bien el incremento de células SA- β -Gal⁺ en el hipocampo es mayor en los animales P8 en comparación con los animales R1 (Figura R2 E).

Estos datos, en conjunto, indican que los animales P8 comienzan a mostrar tanto síntomas de envejecimiento acelerado como patología característica de la Enfermedad de Alzheimer mayoritariamente a los 6 meses de edad. A partir de dicha edad, se potencian sus afecciones produciéndoles una muerte prematura en comparación con la cepa control R1.

CAPÍTULO 2

Caracterización de la actividad de las Células Madre Neurales en la Zona Subventricular de la cepa de ratón SAMP8 y SAMR1

2.1. La proliferación en la SVZ de los animales P8 se incrementa de forma transitoria a los 2 meses de edad y decae a los 14 meses

En primer lugar, para analizar los niveles de actividad proliferativa de las NSCs y de las células progenitoras en la SVZ de los animales P8, administramos BrdU a animales adultos de diferentes edades tanto de las cepas control R1 y Crl:CD1 como de la cepa P8. En este caso, la BrdU se inyectó utilizando un paradigma de administración de 1 inyección cada dos horas hasta un total de 3 inyecciones y se sacrificó a los animales 1 hora más tarde (Figura R3 A). El análisis inmunohistoquímico reveló un incremento sustancial en el número de células proliferativas en animales P8 jóvenes (2 meses) en comparación con los R1 y Crl:CD1 de la misma edad. Sin embargo, este incremento se perdía a edades más avanzadas (10 meses), volviendo a los niveles proliferativos de las cepas control (Figura R3 B y C). Con el objetivo de caracterizar mejor este efecto proliferativo, se incrementó el número de edades estudiadas y se determinó la incorporación de BrdU en los animales P8 y R1. El análisis estadístico realizado mediante ANOVA de dos vías (edad y cepa), mostró que la edad tiene un efecto significativo en el número de células BrdU⁺ ($F_{4,32} = 4.161$, $p < 0.01$) y que la interacción edad-cepa es estadísticamente significativa ($F_{4,32} = 2.909$, $p < 0.05$). Los valores se analizaron de forma relativa con respecto a la cepa control R1 (Figura R3 D). Así, se observó que los animales P8 presentan niveles similares de proliferación a los R1 a 1 mes para, entre 2 y 6 meses, incrementar su actividad y finalmente decaer por debajo de los niveles de la cepa control a edades más tardías (14 meses).

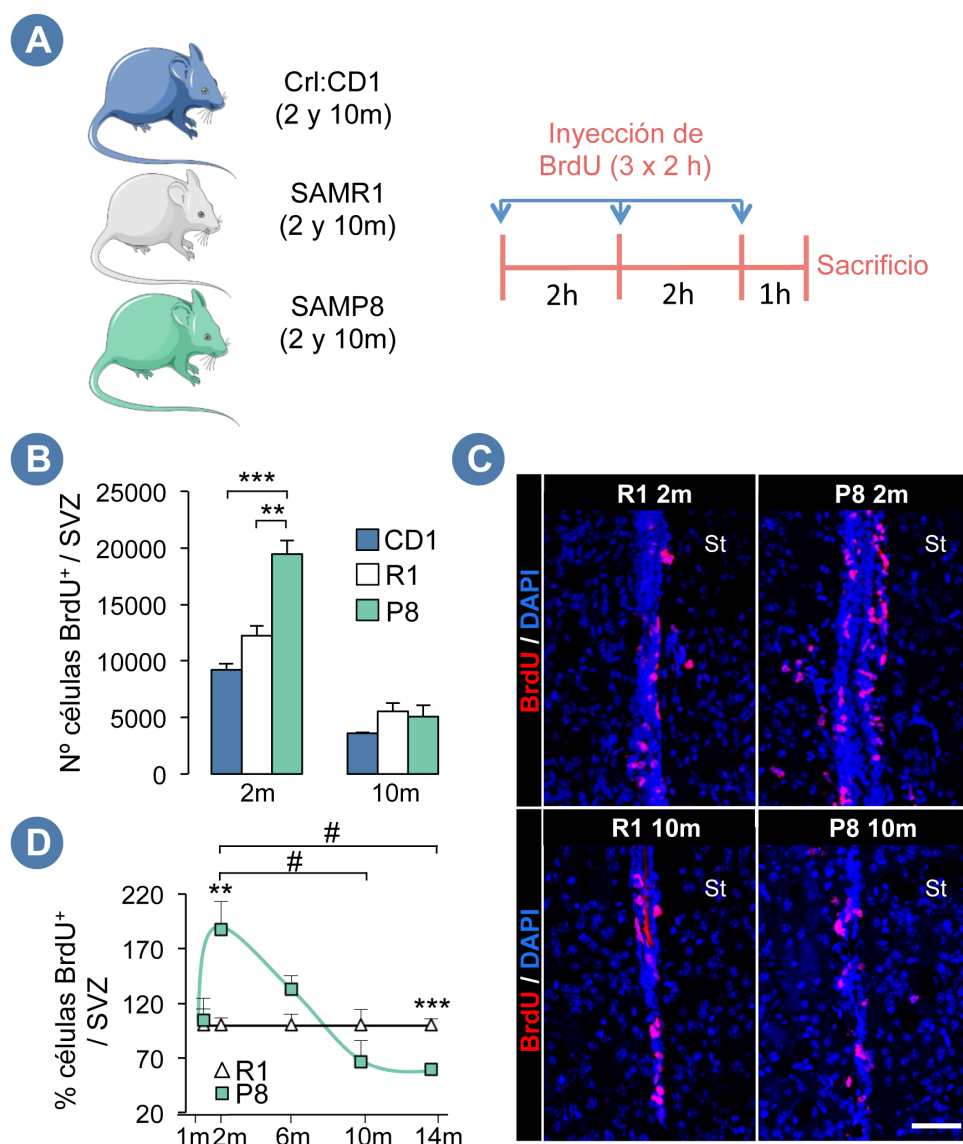


Figura R3. Los animales P8 presentan un pico proliferativo a edades tempranas en la SVZ seguido de una disminución drástica de la proliferación con la edad. **(A)** Diagrama representativo del régimen de BrdU administrado a los animales. El análogo se inyectó (50 mg/kg de peso de animal) tres veces cada 2 horas, y una hora después del último pinchazo, se sacrificaron los animales para su posterior análisis inmunohistoquímico. **(B)** Análisis cuantitativo del número de células BrdU⁺ en la SVZ de animales CD1, R1 y P8 de 2 y 10 meses de edad. Los animales P8 presentan un mayor número de células BrdU⁺ en comparación con los animales CD1 (***) $p < 0,001$ y R1 (**) $p < 0,01$ de 2 meses de edad. **(C)** Microfotografía confocal coronal representativa del número de células BrdU⁺ (rojo) en la SVZ de animales R1 y P8 de 2 y 10 meses de edad. La tinción nuclear DAPI se muestra en azul. **(D)** Porcentaje de células BrdU⁺ de los animales P8 de 1, 2, 6, 10 y 14 meses de edad en relación con los animales R1 de edades equivalentes. Los animales P8 presentan un descenso significativo de la incorporación de BrdU asociado a la edad entre los 2 y los 14 meses de edad (# $p < 0,05$). Los datos se muestran como la media \pm E.E.M. $n \geq 4$. Abreviaturas: St, estriado; SVZ, zona subventricular. Barra calibradora en C, 50 μ m.

2.2. El incremento de proliferación en la SVZ de los animales P8 de 2 meses correlaciona con un aumento en el número de nuevas neuronas en el OB

Las células proliferativas de la SVZ generan neuroblastos de tipo A que migran a través del camino migratorio rostral (RMS) hasta el bulbo olfatorio (OB) donde se integran como interneuronas (Alvarez-Buylla y Garcia-Verdugo, 2002; Lledo et al., 2008). En consonancia con el incremento en proliferación detectado en la SVZ de ratones P8 jóvenes en comparación con R1, se observó un incremento en el número de células BrdU⁺ en el RMS-OB de ratones P8 de 2 meses pero no en el de ratones de 10 meses (Figura R4 A y B). Además, se analizó el número de neuronas inmaduras (DCX⁺) que habían incorporado BrdU en el OB y se observó un incremento significativo en los animales P8 frente a los R1 (Figura R4 C). Se observó también una tendencia al alza en el tamaño de la capa granular del OB (GCL) de los animales P8 respecto a los R1 a 2 meses, aunque las diferencias no fueron significativas ($p = 0,08$). Mientras que la GCL de la cepa control incrementaba sutilmente su tamaño con la edad, la GCL de los animales P8 se mantenía significativamente más pequeña que la de los R1 a los 10 meses (Figura R5 A). Además, el tamaño general del OB era más pequeño tanto a los 2 como a los 10 meses en los animales P8 (Figura R5 B y C). Estos datos sugieren que el incremento en la producción de nuevas neuronas, no va acompañado de un aumento en la supervivencia ni en la integración de dichas neuronas en la estructura del OB de los animales P8 jóvenes.

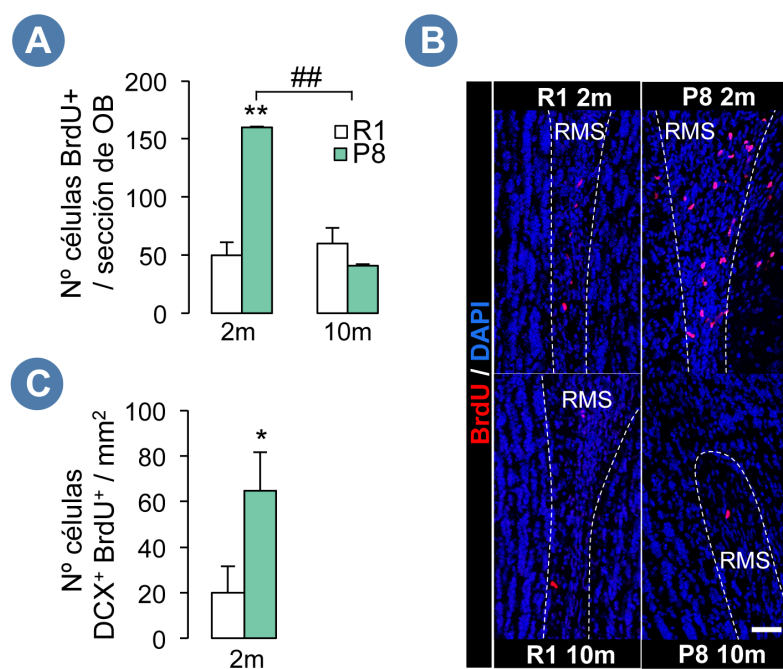


Figura R4. Los animales P8 de 2 meses presentan mayor producción de nuevas neuronas en el OB que los animales R1 de la misma edad. **(A)** Análisis cuantitativo del número de células BrdU⁺ por sección en el OB de animales R1 y P8 de 2 y 10 meses de edad. Los animales P8 jóvenes presentan un mayor número de células en división activa tanto en comparación con los R1 de 2 meses (** $p < 0,01$) como con los P8 de 10 meses (## $p < 0,01$). **(B)** Microfotografía confocal coronal representativa del número de células BrdU⁺ (rojo) en el bulbo de animales R1 y P8 de 2 y 10 meses de edad. La tinción nuclear DAPI se muestra en azul. **(C)** Cuantificación del número de células doble

positivas DCX/BrdU en el OB de animales R1 y P8 de 2 meses de edad. Los animales P8 presentan un mayor número de células DCX⁺ BrdU⁺ que los animales R1 (* $p < 0,05$), indicando una mayor producción de nuevas neuronas que los animales control a edades tempranas. Los datos se muestran como la media \pm E.E.M. $n \geq 4$. Abreviaturas: RMS, camino migratorio rostral; OB, bulbo olfatorio; DCX, doblecortina. Barra calibradora en B, 50 μ m.

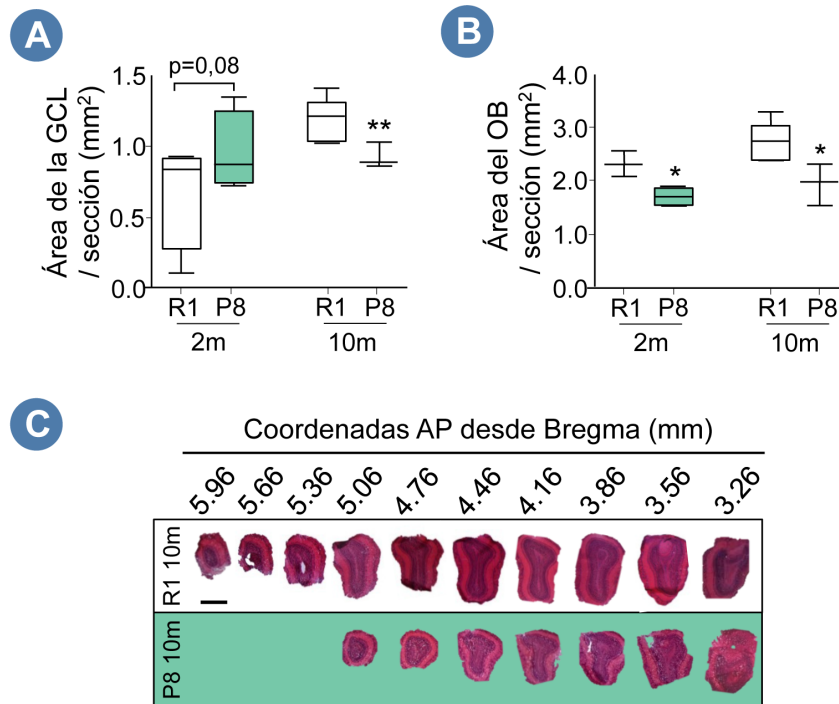


Figura R5. El área del OB de los animales P8 de 2 y 10 meses es menor que la de los R1 pese a la elevada neurogénesis de los P8 a edades tempranas. **(A)** Medida del área de la GCL del OB de animales R1 y P8 de 2 y 10 meses de edad en las coordenadas anteroposteriores (AP) aproximadas al Bregma 3,86. A los 2 meses de edad, la GCL de los animales P8 muestra una tendencia al alza que no llega a ser significativa respecto a los R1 ($p < 0,08$). A los 10 meses de edad, el área de la GCL de los animales P8 es significativamente menor que la de los R1 de la misma edad (** $p < 0,01$). **(B)** Medida del área del OB de animales R1 y P8 de 2 y 10 meses de edad en las coordenadas AP aproximadas al Bregma 3,86 mm. Los animales P8 presentan una menor área del OB tanto a 2 como a 10 meses en comparación con la cepa control (* $p < 0.05$). **(C)** Reconstrucción representativa de la estructura del OB de ambas cepas a los 10 meses de edad. Se muestran cortes coroneales seriados teñidos con HyE. Se observa una reducción en el tamaño del OB de los animales P8 de 10 meses frente a los R1 de la misma edad. Las coordenadas anteroposteriores desde el Bregma se estimaron según la base de datos de *Mus musculus* en brainmaps.org. Los datos se muestran como la media \pm E.E.M. $n \geq 4$. Abreviaturas: GCL, capa celular granular; OB, bulbo olfatorio. Barra calibradora en C, 1000 μ m.

2.3. El incremento en la proliferación de la SVZ de los P8 a edades tempranas correlaciona con un aumento de la actividad de las NSCs (células Tipo-B)

Las NSCs (tipo-B) así como los progenitores de rápida amplificación (tipo-C) son el punto de partida para la progresión de la neurogénesis adulta. Para determinar si el incremento de la actividad proliferativa observada en la SVZ afectaba a estas poblaciones de células residentes en ella, se efectuó una inmunofluorescencia doble para BrdU y Nestina. Así se observó que la inmensa mayoría de las células BrdU⁺ de la SVZ de animales de 2 meses eran también Nestina⁺ (Figura R6 A).

Con el objetivo de esclarecer la implicación específica de las NSCs (tipo-B) en este incremento del número de células BrdU⁺ en la SVZ, se procedió a su estudio mediante el uso de los marcadores específicos de NSCs GFAP y SOX2. Para ello, se inyectó BrdU tanto a animales jóvenes (2 meses) como

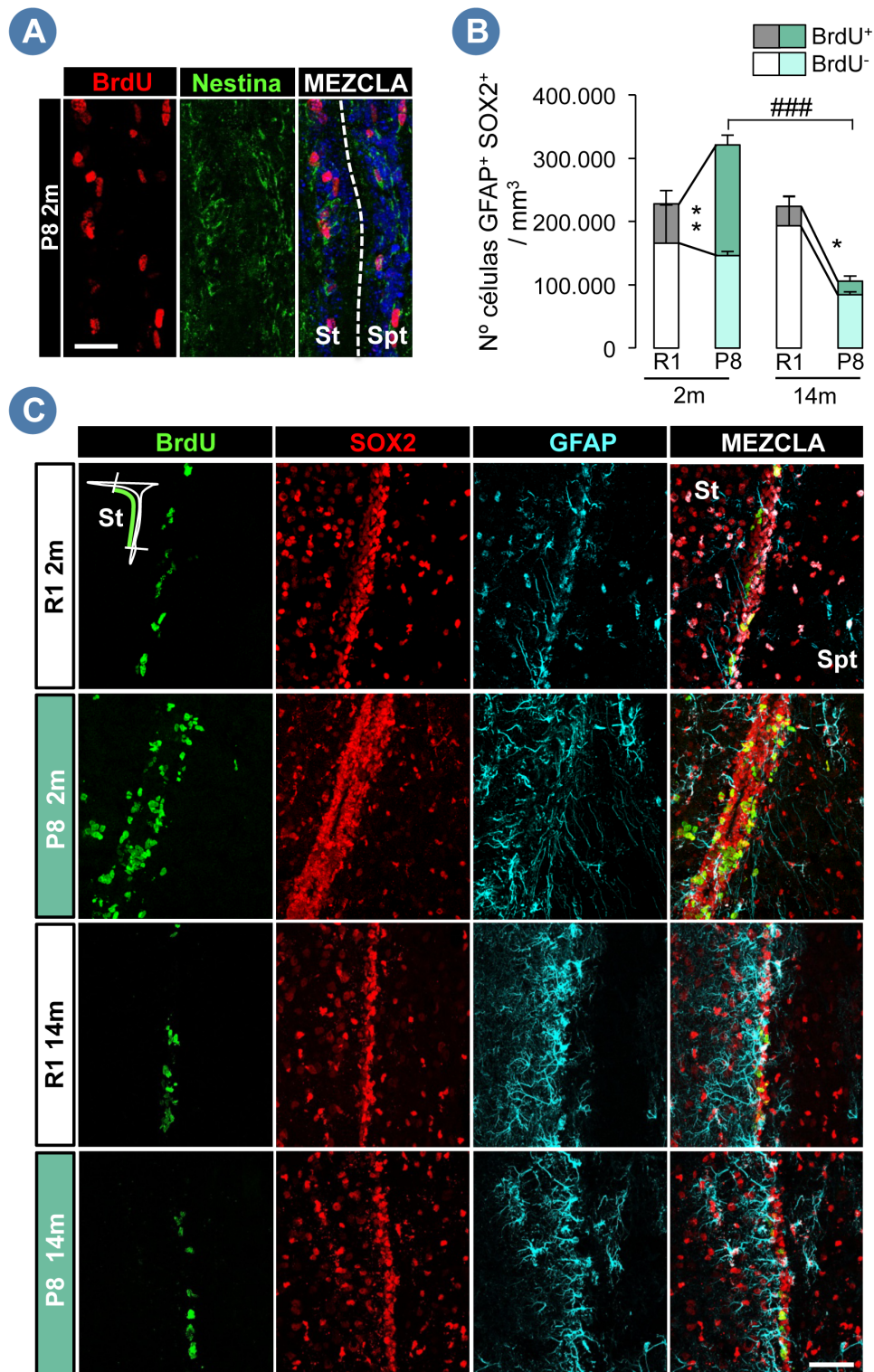


Figura R6. El incremento de la proliferación en la SVZ de los P8 jóvenes, se debe al incremento de actividad proliferativa de las NSCs (células tipo-B). **(A)** Microfotografía confocal mostrando la expresión de Nestina (verde) en las NSCs (tipo-B) y progenitores (tipo-C) BrdU⁺ (rojo) de la SVZ de animales P8 de 2 meses. La tinción nuclear DAPI se muestra en azul. **(B)** Análisis cuantitativo del número de NSCs en división activa (GFAP⁺ SOX2⁺ BrdU⁺) del total de NSCs (GFAP⁺ SOX2⁺) en la SVZ de animales R1 y P8 de 2 y 14 meses. A los 2 meses de edad, los animales P8 presentan un mayor número de NSCs en proliferación activa en comparación con los animales R1 de la misma edad (** $p < 0,01$). A los 14 meses, los animales P8 presentan un menor número de NSCs en proliferación activa en comparación con los R1 de la misma edad (* $p < 0,05$). El número de NSCs en división activa de los P8 disminuye significativamente entre los 2 y los 14 meses de edad (#### $p < 0.001$). **(C)** Imágenes confocales representativas del número de NSCs en división activa en la SVZ de los animales R1 y P8 de 2 y 14 meses de edad. Los datos se muestran como la media \pm E.E.M. $n \geq 3$. Abreviaturas: St, estriado; Spt, septo. Barra calibradora en A y C, 25 μ m y 50 μ m respectivamente.

viejos (14 meses) y se procedió al triple marcaje (GFAP⁺/SOX2⁺/BrdU⁺) para identificar el número de NSCs en fase S. El número total de células tipo-B que incorporaron BrdU en la SVZ estaba incrementado en los animales P8 de 2 meses frente a la cepa control de la misma edad ($p < 0,01$, Figura R6 B y C). Observamos también un incremento en su tasa de actividad, es decir, en el porcentaje de células con triple marcaje GFAP⁺/SOX2⁺/BrdU⁺ en los animales P8 (media \pm EEM: $33,1\% \pm 4,1\%$ en R1 frente a $50,8\% \pm 4,2\%$ en P8, $p < 0,01$). De acuerdo con estos datos, también se observó un engrosamiento de la pared ventricular en los animales P8 de 2 meses (media \pm EEM: $11,1 \pm 1,2 \mu\text{m}$ en SAMR1 frente a $15,9 \pm 0,5 \mu\text{m}$ en SAMP8, $p < 0,01$).

En concordancia con el menor número de células BrdU⁺ en la SVZ de animales P8 de 14 meses, dichos animales presentaron un menor número de NSCs en fase S comparados con los P8 de 2 meses ($p < 0,001$) así como comparados con los R1 de 14 meses ($p < 0,05$, Figura R6 B y C).

Estos datos indican que a pesar de que la proliferación de las NSCs en animales P8 jóvenes está incrementada, se ve seriamente comprometida a edades tardías en comparación con la cepa R1.

2.4. Los cultivos de NSCs de animales P8 jóvenes muestran una mayor proliferación que los de R1 de la misma edad

Con el objetivo de esclarecer el mecanismo subyacente al incremento de la proliferación de las NSCs de animales P8 de 2 meses, se llevaron a cabo cultivos primarios de células madre procedentes de la SVZ de ratones P8 y R1 de diferentes edades. En ausencia de un sustrato de adhesión y en presencia de estimulación mitogénica (EGF y FGF2), las células madre forman agregados clonales denominados neuroesferas. Éstas están constituidas tanto por NSCs como por células progenitoras que derivan de ellas. Así, se observó un incremento en el número de neuroesferas primarias en los animales P8 de 2 meses comparados con R1 (Figura R7 A y C) y Crl:CD1(ICR) (media \pm EEM: 222 ± 26 número de neuroesferas en los CD1 y 669 ± 133 en los P8, $p < 0,01$). Del mismo modo, las neuroesferas procedentes de P8 de 2 meses, mostraron un tamaño significativamente mayor que las R1 (Figura R7 B y C) y que las Crl:CD1 (media \pm EEM: $156 \pm 5 \mu\text{m}$ en los CD1 y 201 ± 46 en los P8, $p < 0,05$). Este fenotipo in vitro refleja la presencia de un mayor número de células madre en el animal in vivo (número de neuroesferas primarias) así como una mayor actividad proliferativa (tamaño de las neuroesferas primarias) en los P8 de 2 meses frente a las cepas control. El factor “edad”, analizado estadísticamente mediante ANOVA tanto para el número ($F_{(5,20)} = 61$) como para el diámetro ($F_{(3,11)} = 215$). de las neuroesferas, mostró un efecto significativo tanto en la cepa P8 como en la R1. Así, el número y tamaño de las neuroesferas fue menor en los animales viejos respecto a los jóvenes.

Las alteraciones en la actividad proliferativa de las NSCs podían deberse a factores extrínsecos a ellas, como modificaciones en las señales de nicho que influyen en el cultivo primario, a mecanismos

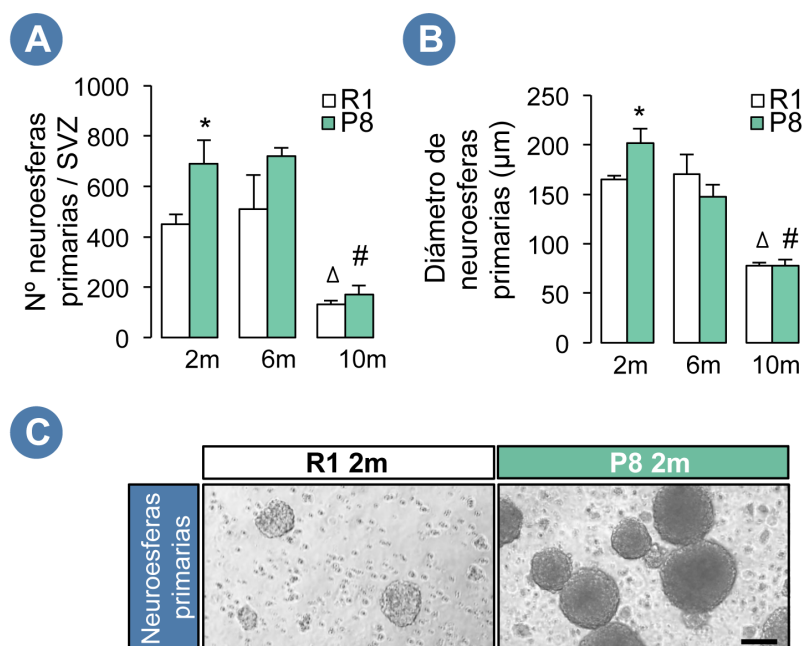


Figura R7. Los cultivos primarios de NSCs de SVZ de animales P8 jóvenes muestran una mayor proliferación que los R1 de la misma edad. **(A)** Cuantificación del número de neuroesferas primarias generadas tras 7 div por cada SVZ (1 único hemisferio) de animales R1 y P8. Se observa un mayor número de neuroesferas primarias en los animales P8 de 2 meses frente a su cepa control R1 (* $p < 0,05$). Ambas cepas presentan una disminución del número de neuroesferas con la edad (P8, # $p < 0,05$; R1, Δ $p < 0,05$). **(B)** Análisis cuantitativo de la medida de los diámetros de las neuroesferas primarias de R1 y P8 a distintas edades. Los animales P8 de 2 meses muestran un mayor diámetro en sus neuroesferas primarias en comparación con los R1 (* $p < 0,05$). Nuevamente, este incremento, se pierde durante el envejecimiento no sólo en los animales P8 (# $p < 0,05$) si no también en los R1 (Δ $p < 0,05$). **(C)** Imágenes representativas de las neuroesferas primarias de animales R1 y P8 de 2 meses de edad tras 7 div. Los datos se muestran como la media \pm E.E.M. $n \geq 3$. Barra calibradora en C, 100 μ m.

autónomos de las propias células que se mantienen *in vitro* a lo largo de los pases o a una combinación de ambos factores. Para esclarecer el motivo del incremento en la proliferación de las NSCs de los P8 jóvenes y si el efecto se perpetuaba *in vitro*, los cultivos de neuroesferas de los P8 y R1 se pasaron 3 veces. De este modo, se observó que los animales P8 de 2 meses generaron un mayor número de neuroesferas secundarias (Figura R8 A y C), que eran de mayor tamaño que las neuroesferas de cultivos de animales R1 de la misma edad (Figura R8 B y D).

El índice clonogénico de las células P8 fue 2,3 veces mayor que el de las células R1 (media \pm EEM: 3 % \pm 0,3 en R1 frente a 7 % \pm 0,6 en P8, $p < 0,001$, $n = 10$). De forma concordante con estos datos, se observó que el porcentaje de células que incorporaron BrdU fue más alto en las neuroesferas P8 frente a las R1

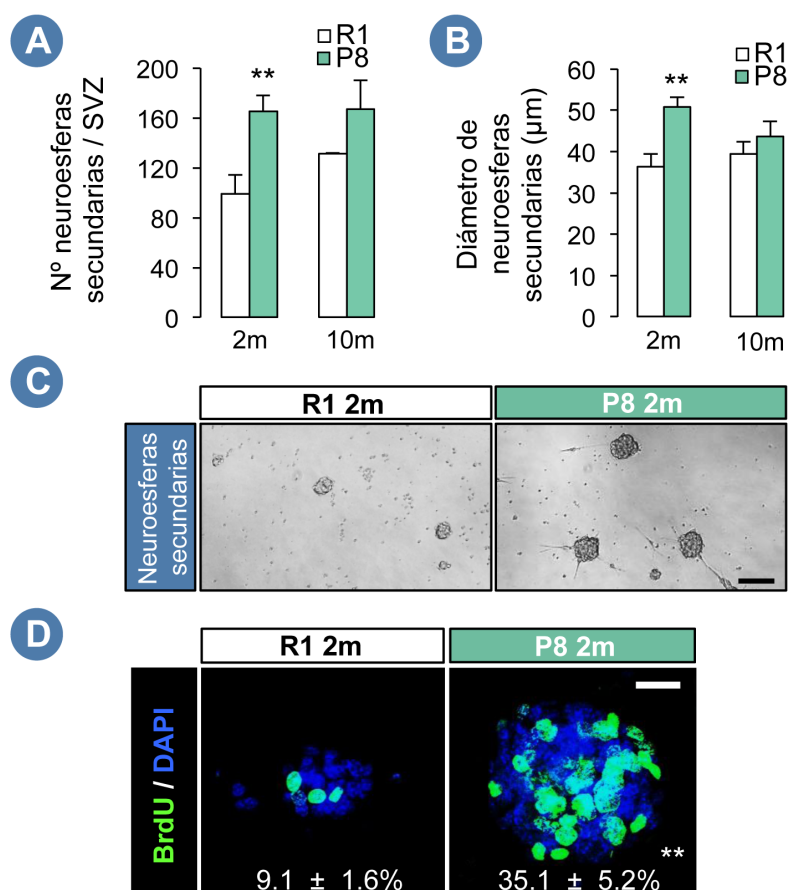


Figura R8. Los cultivos de NSCs de SVZ de animales P8 jóvenes muestran una mayor proliferación que los R1 a lo largo de los pases. **(A)** Cuantificación del número de neuroesferas secundarias generadas tras 7 div de animales R1 y P8. Las células se sembraron a una concentración de 12.500 células/ml. Se observa un incremento en la capacidad de esferogénica de los animales P8 de 2 meses frente a su cepa control R1 (** $p < 0,01$). **(B)** Análisis cuantitativo de la medida de los diámetros de las neuroesferas secundarias de R1 y P8 a los 2 y 10 meses de edad. Los animales P8 de 2 meses muestran una mayor capacidad de proliferación en comparación con los R1 de la misma edad (** $p < 0,01$). **(C)** Imágenes representativas de las neuroesferas secundarias de animales R1 y P8 de 2 meses de edad tras 7 div. **(D)** Análisis mediante inmunofluorescencia de la incorporación de BrdU (verde) en neuroesferas secundarias de animales R1 y P8 de 2 meses de edad. Se observa un incremento significativo de la actividad proliferativa de los animales P8 frente a los R1. Los datos se muestran como la media \pm E.E.M. $n \geq 5$. Barra calibradora en C y D, 100 μm y 20 μm respectivamente.

(Figura R8 D, $p < 0,01$, $n = 3$). Además, se detectó un aumento significativo en la expresión del gen *Ccnd1* que codifica para la proteína CICLINA D1 (media de expresión relativa \pm EEM: 1,1 \pm 0,2 en neuroesferas R1 frente a 2,3 \pm 0,3 en neuroesferas P8, $p < 0,05$, $n = 3$).

En cuanto a la actividad proliferativa de las neuroesferas secundarias de R1 y P8 a los 10 meses, no se observaron diferencias significativas (Figura R8 B). Así, los datos *in vitro* sugieren un papel importante de los mecanismos autónomos de las NSCs en el incremento de su actividad proliferativa en los P8 jóvenes.

2.5. Análisis de los mecanismos autónomos implicados en el aumento de la proliferación y la formación de esferas en los cultivos de NSCs de animales P8 jóvenes

Los mecanismos autónomos de las células que inducen su proliferación pueden referirse bien a sistemas de señalización autocrina o paracrina de las NSCs, de forma que secreten moléculas de señalización que les afecten sólo a ellas o también a las células circundantes, o bien a cambios intrínsecos de las NSCs que conduzcan a un incremento en la progresión de su ciclo celular.

2.5.1. Las neuroesferas P8 secretan factores solubles que incrementan la actividad de las NSCs

Para analizar los posibles mecanismos autocrinos o paracrinos de las NSCs, el medio condicionado (MC) de neuroesferas P8 de 2 meses se empleó para tratar neuroesferas R1 de la misma edad y viceversa. Curiosamente se observó cómo el MC-P8 aumentó el número de neuroesferas R1 mientras que el MC-R1 no produjo ningún efecto significativo en el número de neuroesferas P8 (Figura R9 A). El diámetro de las neuroesferas R1 crecidas en MC-P8 se mantuvo constante mientras que las propias neuroesferas P8 tratadas con su MC incrementaron su diámetro (Figura R9 B). Estos datos apuntan a la secreción de un factor soluble por parte de las neuroesferas P8 que incrementa la formación de esferas. La concentración de dicho factor en el MC no sería suficiente para incrementar el diámetro de las neuroesferas R1.

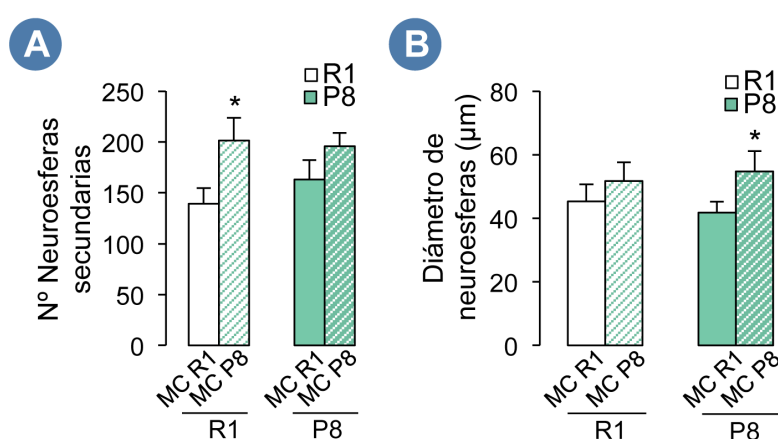


Figura R9. Las neuroesferas P8 secretan factores solubles pro-proliferativos. (A) Cuantificación del número de neuroesferas de ambas cepas tras 7div en presencia de medio condicionado (MC) procedente tanto de neuroesferas R1 como de neuroesferas P8. Las células R1 crecidas en presencia del MC de neuroesferas P8 muestran una mayor capacidad esferogénica en comparación con las crecidas en MC de neuroesferas R1 (* $p < 0,05$). (B) Medida del diámetro de las neuroesferas de ambas cepas tras 7div en presencia de medio condicionado. Las neuroesferas de animales P8 presentan una mayor tasa de proliferación en presencia de su propio medio condicionado (MC P8) en comparación con las neuroesferas P8 crecidas en medio R1 (MC R1). Los datos se muestran como la media \pm E.E.M. $n \geq 7$.

2.5.2. El péptido A β como posible factor secretado por las NSCs de los P8 jóvenes

Teniendo en cuenta que los animales SAMP8 sobreexpresan la proteína precursora de amiloide beta (APP) (Kumar et al., 2000; Morley et al., 2000; Nomura et al., 1996) y que el péptido A β (1-42) aumenta la proliferación de las neuroesferas de la SVZ *in vitro* (Heo et al., 2007; Sotthibundhu et al., 2009), se planteó la posibilidad de que las neuroesferas P8 pudieran liberar A β al medio, incrementando de esta forma la actividad proliferativa de las células. Debido a que el péptido A β es un derivado proteolítico de APP generado mediante la actividad de la gamma secretasa presenilina 1, se realizó una primera aproximación a la hipótesis determinando los niveles de expresión de *App* y *Psen1* en neuroesferas secundarias R1 y P8 por RT-qPCR. Se observó un incremento significativo en la expresión de *App* en las neuroesferas P8 comparadas con las R1 (Figura R10 A) mientras que los niveles de expresión del mRNA de *Psen1* fueron comparables en ambas cepas.

A continuación, se llevó a cabo la inmunodepleción *in vitro* de A β en células P8 mediante la adición del anticuerpo 4G8, que fue generado contra los residuos del 17 al 24 de A β y que reconoce así las

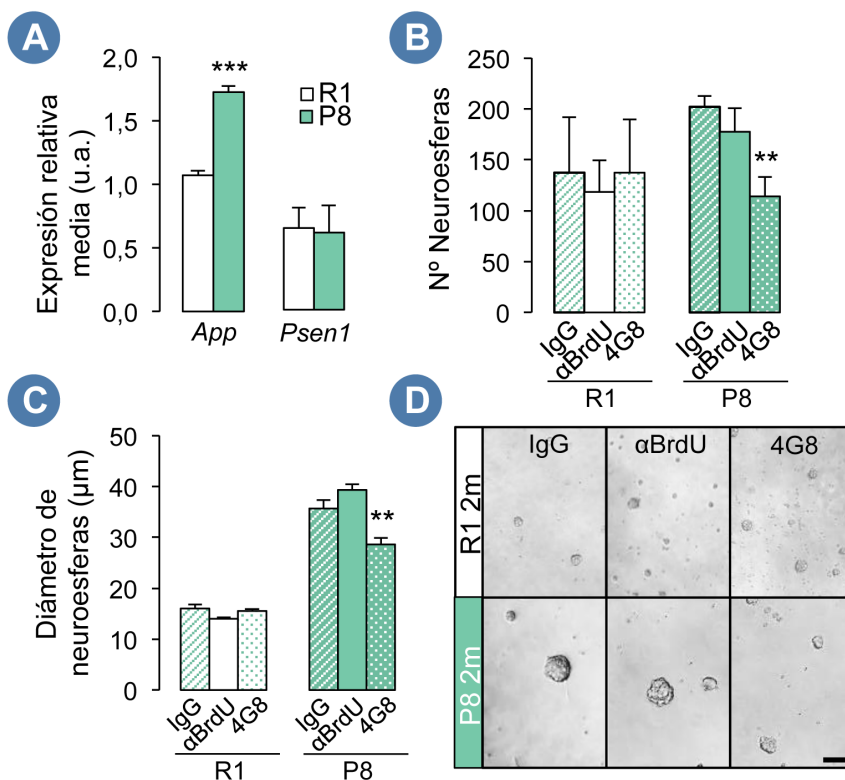


Figura R10. El péptido A β como posible molécula pro-proliferativa y pro-esferogénica secretada por animales P8 de 2 meses. **(A)** Expresión relativa media de los genes *App* y *Psen1* en neuroesferas de 2 meses de animales R1 y P8. Las neuroesferas procedentes de animales P8 muestran un incremento en la expresión de mRNA de *App* en comparación con la cepa control R1 (***) ($p < 0,001$). **(B)** Análisis cuantitativo del número de neuroesferas R1 y P8 de 2 meses tras la inmunodepleción de A β . Se observa un menor número de neuroesferas P8 en ausencia del péptido en comparación con las condiciones control (anticuerpo anti-IgG y anti-BrdU) (** $p < 0,01$).

(C) Medida del diámetro de las neuroesferas de ambas cepas tras la inmunodepleción de A β . Las neuroesferas P8 disminuyen su diámetro en ausencia del péptido en comparación con las condiciones control (** $p < 0,01$), mientras que las neuroesferas R1 mantienen su tasa proliferativa. **(D)** Imagen representativa de las neuroesferas R1 y P8 en presencia de los anticuerpos control anti-IgG y anti-BrdU así como en presencia del anticuerpo anti-A β . Los datos se muestran como la media \pm E.E.M. $n \geq 7$. Barra calibradora en D, 50 μ m.

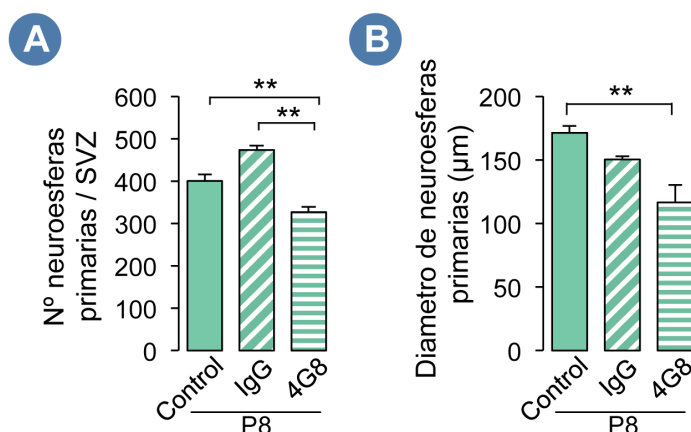


Figura R11. La inmunodepleción del péptido A β reduce la capacidad esferogénica y proliferativa de los cultivos primarios de animales P8 de 2 meses. **(A)** Cuantificación del número de neuroesferas primarias después de 7 div en presencia de los anticuerpos IgG y 4G8 (anti-A β). La actividad esferogénica de las células primarias disminuye en presencia del anticuerpo 4G8 en comparación con los cultivos control (** $p < 0,01$). **(B)** Medida de los diámetros de las neuroesferas primarias tras 7 div en presencia de los anticuerpos IgG y 4G8. La actividad proliferativa de las neuroesferas primarias disminuye en presencia de 4G8 en comparación con los cultivos control. Los datos se muestran como la media \pm E.E.M. $n \geq 3$.

isoformas A β (1-42), A β (1-40) y la proteína precursora APP, pero no otros derivados proteolíticos de APP como sAPP o s β APP. Como condiciones control, se emplearon anticuerpos contra inmunoglobulinas de ratón (α IgG) así como anticuerpos que reconocen antígenos no relacionados (α BrdU). Como se muestra en la figura R10 B, C y D, el bloqueo de A β (1-42) y A β (1-40) o la interacción del anticuerpo 4G8 con APP, disminuye significativamente el número y tamaño de las neuroesferas P8. Este efecto se observó igualmente en cultivos primarios de NSCs de animales P8 de 2 meses tratados con anticuerpo 4G8 (Figura R11 A y B). Estos datos en conjunto indican que el A β (1-42), A β (1-40) o APP presente o secretado por las células P8 estimulan la capacidad esferogénica y proliferativa de los cultivos de NSCs adultas. Teniendo en cuenta que el MC-P8 produce un efecto significativo sobre los cultivos R1, los datos sugieren que el anticuerpo 4G8 inhibe la elevada actividad de las NSCs de animales P8 mediante el bloqueo de formas solubles de A β .

2.5.3. Los animales P8 de 2 meses presentan *in vivo* niveles ligeramente más altos de A β (1-42) en la SVZ

Estudios previos muestran cómo A β (1-42) pero no A β (1-40) incrementa no sólo el número si no también el diámetro de las neuroesferas de la SVZ (Sotthibundhu et al., 2009). Así, se llevó a cabo un ensayo de inmunoabsorbancia asociado a reacción enzimática (ELISA) (Figura R12 A) para el análisis de los niveles de A β (1-42) presente en el tejido de la SVZ y el DG de animales R1 y P8 de 2 meses. Se

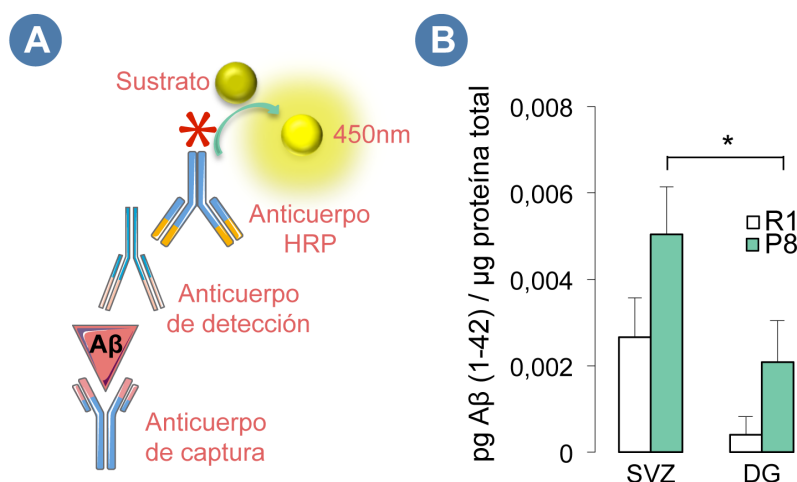


Figura R12. Los animales P8 de 2 meses presentan cantidades más altas de péptido Aβ (1-42) en la SVZ en comparación con los animales R1 y con el DG de animales R1 y P8. (A) Esquema ilustrativo del sistema de detección ELISA para el péptido Aβ (1-42) empleado en tejido diseccionado de SVZ y DG de animales R1 y P8 de 2 meses de edad. (B) Determinación de la concentración total de Aβ (1-42) en la SVZ y DG de animales R1 y P8. Los animales P8 presentan un incremento de 2 veces en la concentración de Aβ (1-42) mostrada por la SVZ de los R1. Los animales P8 muestran concentraciones significativamente menores a las de la SVZ en el DG (* p < 0,05). Los datos se muestran como la media ± E.E.M. n ≥ 5.

observó cómo los animales P8 presentaban una tendencia hacia una mayor cantidad de Aβ (1-42) en su SVZ (media ± EEM: 0,0050 ± 0,001 pg/μg proteína total) que los animales R1 (media ± EEM: 0,0026 ± 0,001 pg/μg proteína total) (p = 0,079, Figura R12 B) a pesar de no presentar diferencias estadísticamente significativas dada la variabilidad de las muestras. Cabe destacar que los niveles de Aβ (1-42) en la SVZ de los animales P8 son significativamente más altos que los presentados por estos animales en el DG (media ± EEM: 0,0020 ± 0,0010 pg/μg proteína total) (Figura R12 B). Estos datos, apuntan a un incremento de las cantidades de Aβ (1-42) en la SVZ de los animales P8 frente a los animales control R1 así como frente al DG de los propios P8.

2.5.4. El péptido Aβ (1-42) aumenta la actividad de las NSCs de animales R1

Con el objetivo de demostrar la hipótesis de que el Aβ (1-42) soluble liberado por las células P8 es el responsable del incremento proliferativo de éstas, se trataron NSCs en cultivo de animales R1 de 2 meses con Aβ (1-42) sintético murino (mAβ (1-42)) a concentraciones crecientes pero bajas para evitar su citotoxicidad. Se observó un incremento en la capacidad clonogénica de las NSCs de animales R1 incluso a concentraciones muy bajas de mAβ (1-42) (≥1 ng/ml, que corresponde a ≥0,2 nM, Figura R13 A) alcanzando el punto máximo de dicha capacidad en presencia de 2 ng/ml del péptido (p < 0,001, n = 10). El incremento en el diámetro y por tanto en la capacidad proliferativa de las células en cultivo,

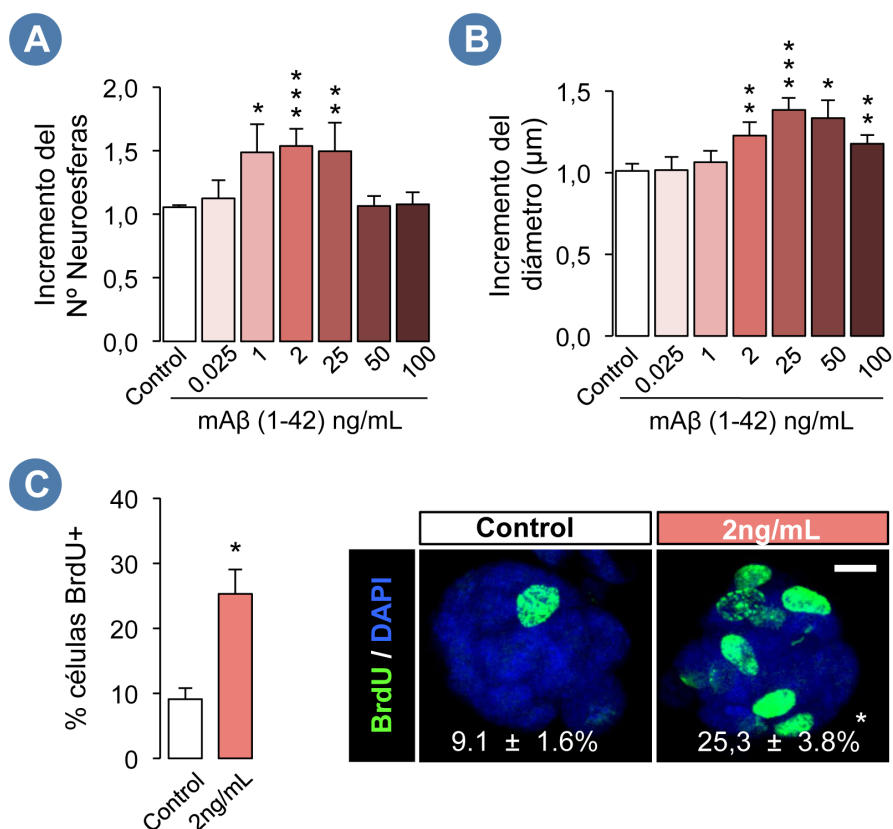


Figura R13. El péptido Aβ (1-42) aumenta la actividad de las neuroesferas R1. (A) Cuantificación del número de neuroesferas generadas a los 7 div creciendo tanto en medio control como en medio con concentraciones crecientes de mAβ (1-42). Las células R1 sembradas en presencia de 1, 2 o 25 ng/ml de mAβ (1-42) muestran una mayor actividad esferogénica en comparación con las células sin tratar (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ respectivamente). Este incremento en la actividad, alcanza su pico máximo a la concentración de 2 ng/ml (*** $p < 0,001$). (B) Medida de los diámetros de las esferas R1 de 2 meses tratadas con concentraciones crecientes del péptido mAβ (1-42). Las neuroesferas R1 incrementan su diámetro a partir de concentraciones del péptido ≥ 2 ng/ml (** $p < 0,01$). (C) Análisis mediante inmunofluorescencia de la incorporación de BrdU (verde) en neuroesferas secundarias de animales R1 crecidas en medio control o en medio en presencia de mAβ (1-42) (2 ng/ml). Las neuroesferas R1 incrementan el porcentaje de células que incorporan BrdU en presencia del péptido (* $p < 0,05$). La tinción nuclear DAPI se muestra en azul. Los datos se muestran como la media \pm E.E.M. $n \geq 4$. Barra calibradora en C, 10 μ m.

se observó a concentraciones mayores (≥ 2 ng/ml, Figura R13 B) con un valor de proliferación máximo a los 25 ng/ml del péptido mAβ (1-42) ($p < 0,001$, $n = 10$). Concentraciones ≥ 50 ng/ml no presentaron efecto en el número de neuroesferas pero continuaron incrementando el diámetro de las mismas (Figura R13 A y B).

Dado que 2 ng/ml fue la concentración mínima del péptido mAβ (1-42) donde se observó efecto tanto en formación de neuroesferas como en proliferación, fue dicha concentración la empleada en los análisis posteriores. Así, se trataron neuroesferas secundarias de animales R1 de 2 meses seguidas de un pulso de BrdU y se observó un incremento de 2,8 veces en el porcentaje de células que incorporaron el

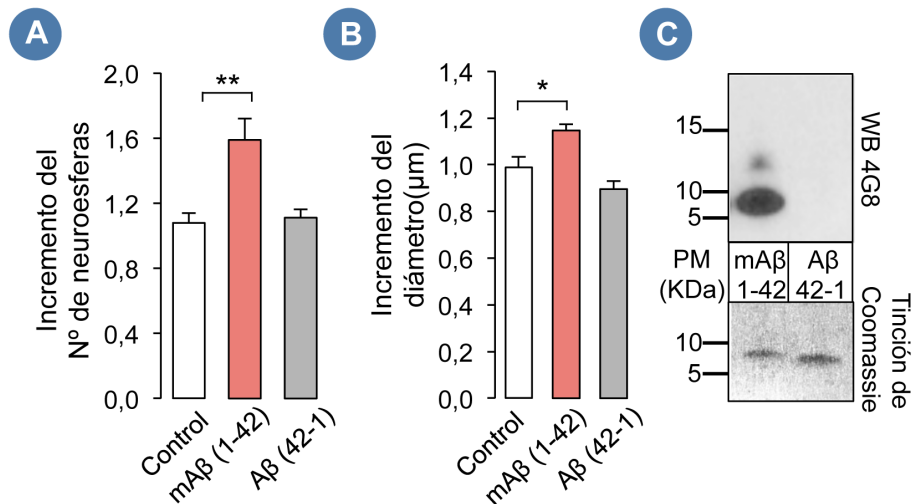


Figura R14. El efecto esferogénico y pro-proliferativo es específico del péptido Aβ (1-42). (A) Cuantificación del número de neuroesferas R1 generadas a los 7 div creciendo en medio control, en medio con 2 ng/ml de Aβ (1-42) o en medio con el péptido reverso Aβ (42-1) empleado como control de especificidad. La actividad esferogénica aumenta en presencia del péptido Aβ (1-42) (** $p < 0,01$) pero no en presencia del péptido reverso. (B) Medida cuantitativa del diámetro de las neuroesferas R1 de 2 meses tras 7 div en presencia de 2 ng/ml de Aβ (1-42) o en presencia del péptido reverso a la misma concentración. Las neuroesferas R1 incrementan su diámetro en presencia de Aβ (1-42) (* $p < 0,05$) pero no en presencia de Aβ (42-1). (C) Detección por Western Blot (mediante el uso del anticuerpo 4G8) y análisis por tinción de Coomassie del estado de agregación de los péptidos Aβ (1-42) y Aβ (42-1). Los monómeros representan la conformación mayoritaria de la preparación. Los datos se muestran como la media \pm E.E.M. $n \geq 4$.

análogo ($p < 0,05$, Figura R13 C) y de 1,3 veces en el diámetro en comparación con las células control ($p < 0,05$, $n = 10$).

Para confirmar la especificidad del péptido mAβ (1-42) a 2 ng/ml en la inducción de la proliferación, se empleó el péptido sintético humano reverso Aβ (42-1) a la misma concentración, sin observarse ningún efecto ni en formación de neuroesferas ni en proliferación (Figura R14 A y B). Adicionalmente se comprobó el estado de agregación del péptido, que fue mayoritariamente monomérico aunque también se observó una cantidad minoritaria de péptido en estado dimérico (Figura R14 C).

Estos datos demuestran que la presencia de mAβ (1-42) a concentraciones bajas (2 ng/ml) y, principalmente en estado monomérico, incrementa la capacidad esferogénica de las células R1 de 2 meses así como su proliferación.

2.6. La inhibición de la vía de señalización PI3K/AKT en las NSCs de la SVZ bloquea la actividad de Aβ (1-42)

Con el objetivo de caracterizar la vía de señalización implicada en el efecto esferogénico y proliferativo

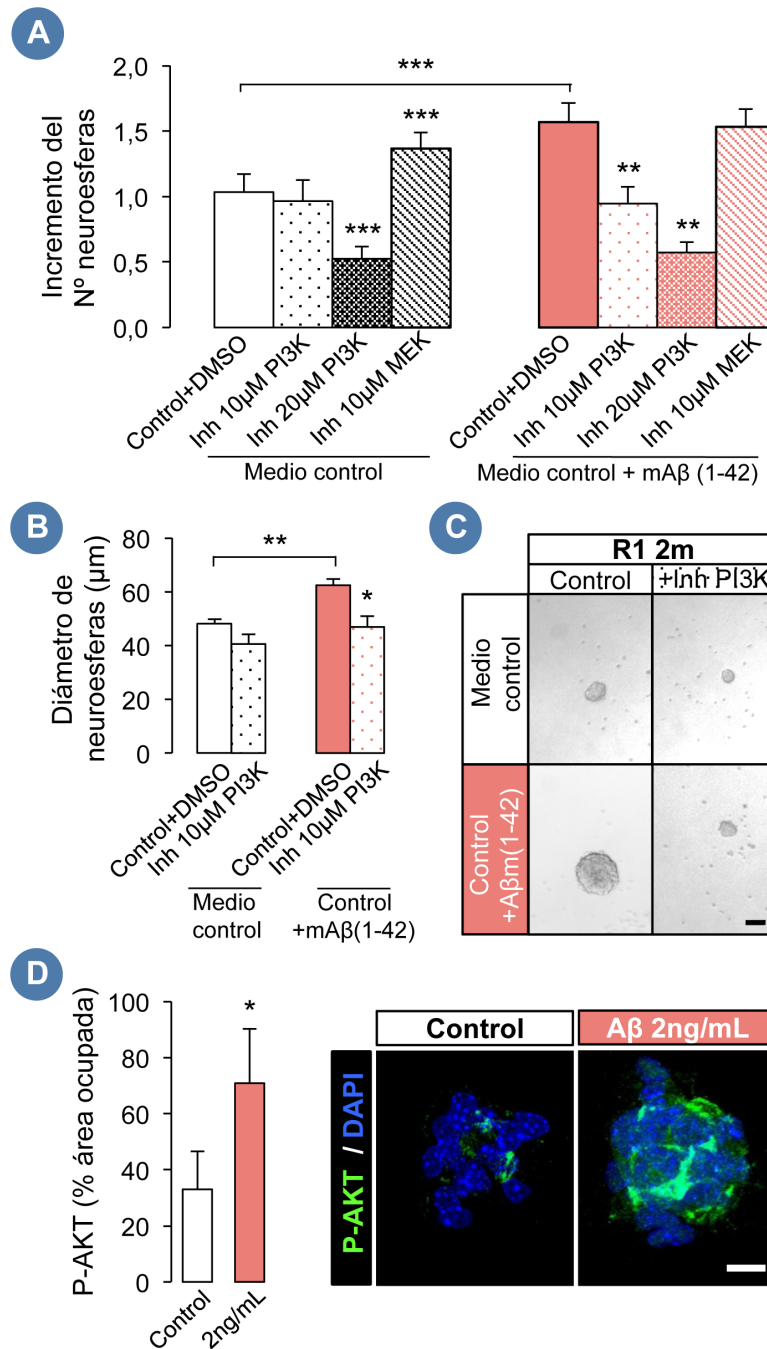


Figura R15. La inhibición de la vía de señalización PI3K/AKT en las NSCs de la SVZ bloquea la actividad del péptido Aβ (1-42). **(A)** Cuantificación del número de neuroesferas R1 en presencia y ausencia del inhibidor de PI3K, LY29002, a diferentes concentraciones en presencia y ausencia de 2 ng/ml de mAb (1-42). La presencia de 10 µM del inhibidor, reduce la actividad esferogénica de las neuroesferas tratadas con mAb (1-42) a los niveles control (** $p < 0,01$). El inhibidor de MEK no bloquea el efecto de mAb (1-42). **(B)** Medida cuantitativa de los diámetros de las neuroesferas tras el tratamiento con el inhibidor de PI3K. Las neuroesferas tratadas con mAb (1-42) en presencia de 10 µM del inhibidor, muestran un diámetro disminuido frente a sus controles (* $p < 0,05$). **(C)** Imágenes representativas de las neuroesferas de animales R1 de 2 meses en presencia y ausencia de mAb (1-42) y del inhibidor de PI3K. **(D)** Análisis inmunocitoquímico del área ocupada por P-AKT (Thr308) (verde) en las neuroesferas R1 de 2 meses crecidas en presencia y ausencia de Aβ (1-42). Las neuroesferas tratadas con Aβ (1-42) muestran un mayor nivel de fosforilación de AKT (* $p < 0,05$) en comparación con los controles. La tinción nuclear DAPI se muestra en azul. Los datos se muestran como la media \pm E.E.M. $n \geq 4$. Barra calibradora, 10 µm.

del péptido mA β (1-42), se analizó la vía PI3K/Akt como posible candidata, dado que existen evidencias cada vez mayores que sugieren que dicha vía está implicada en la señalización de los oligómeros de A β y se encuentra alterada en el cerebro de pacientes de la Enfermedad Alzheimer (Griffin et al., 2005; Jimenez et al., 2011; Zhao et al., 2008). Además, se ha descrito que el péptido A β induce estrés oxidativo en los animales P8 (Takagane et al., 2015) y que los niveles de ROS se ven incrementados en presencia del péptido A β (Glabe, 2001). Adicionalmente se ha descrito que las especies reactivas de oxígeno (ROS) inducen la proliferación de las NSCs de la SVZ a través de la vía PI3K/Akt (Le Belle et al., 2011). Se analizó pues si la señalización a través de la vía PI3K es necesaria para el efecto de A β (1-42) sobre los cultivos de SVZ de animales R1 de 2 meses.

Se observó que concentraciones no tóxicas del inhibidor de PI3K LY294002 (10 μ M) bloqueaban el efecto esferogénico del mA β (1-42) dado que el número de neuroesferas disminuyó hasta los niveles mostrados por cultivos control sin tratar con mA β (1-42) (Figura R15 A). Concentraciones mayores del inhibidor LY294002 (20 μ M) disminuyeron la formación de esferas incluso en cultivos control, reforzando la idea de que la vía de señalización PI3K/Akt es esencial en el control de la actividad de las NSCs. Por el contrario, la inhibición de la vía de señalización de ERK mediante el uso del inhibidor de MEK (U0126) no suprimió la actividad esferogénica inducida por mA β (1-42) (Figura R15 A) y aumentó dicha actividad en los cultivos control que no habían sido tratados con el péptido. La inhibición de la vía de PI3K también bloqueó el efecto proliferativo de mA β (1-42) (Figura R15 B y C).

Teniendo en cuenta que la activación de la vía de PI3K induce la translocación de AKT a la membrana plasmática donde se fosforila en el residuo Thr308, se realizó una inmunotinción para P-AKT (Thr308) sobre células R1 tratadas con 2 ng/ml de mA β (1-42). Como se observa en la figura R15 D, los niveles de P-AKT en dichas células se incrementaron en presencia del péptido sintético indicando que el efecto del péptido en NSCs en cultivo está mediado por la vía de señalización PI3K ($p < 0,05$, $n = 3$).

CAPÍTULO 3

Caracterización de la actividad de las Células Madre Neurales en el Giro Dentado del Hipocampo de las cepas de ratón SAMP8 y SAMR1.

Dado que el hipocampo es una de las primeras regiones que presenta síntomas patológicos de la EA, resulta especialmente interesante la caracterización de la actividad de sus NSCs a lo largo de la progresión de la enfermedad y especialmente a edades tempranas, previas a la aparición de los síntomas. Este estudio podría arrojar luz sobre la posible implicación de la neurogénesis en la EA así como sobre su afectación durante la enfermedad.

3.1. La actividad proliferativa en la SGZ de animales P8 y R1 disminuye durante el envejecimiento

En base a los resultados obtenidos en el análisis de la SVZ, se caracterizó la actividad proliferativa en la SGZ del giro dentado del hipocampo de los animales P8 a distintas edades para establecer posibles similitudes o diferencias en la regulación de las células madre de ambos nichos. Para ello, se administró BrdU a animales de diferentes edades en el mismo régimen empleado para el estudio proliferativo de la SVZ, basado en la inyección de BrdU cada 2 horas hasta un total de 3 inyecciones (3 x 2 horas) y, una hora después de la última inyección, se procedió al sacrificio de los animales (Figura R16 A).

El análisis estadístico realizado mediante ANOVA de dos vías (edad y cepa) mostró una disminución del número de células BrdU⁺ asociado a la edad en ambas cepas ($F_{4,49} = 50,78$, $p < 0,001$). Adicionalmente y de forma similar, aunque previa en el tiempo, a lo observado en la SVZ (Figura R3 D), los niveles proliferativos presentados por los animales P8 se situaron por debajo de los niveles control a los 6 meses de edad (Figura R16 B y C).

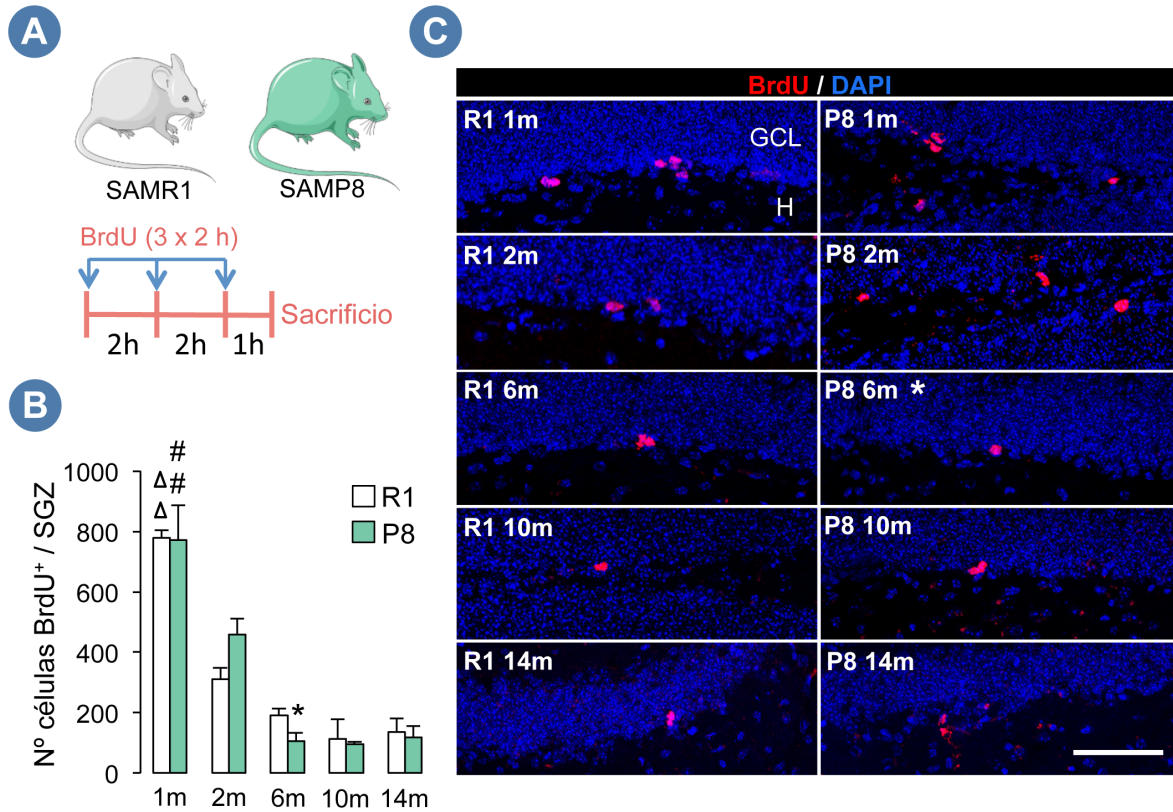


Figura R16. La actividad proliferativa de la SGZ de animales R1 y P8 disminuye con la edad. **(A)** Diagrama representativo del régimen de BrdU administrado a los animales. El análogo se inyectó (50mg/kg de peso de animal) tres veces cada 2 horas, y una hora después del último pinchazo, se sacrificaron los animales para su posterior análisis inmunohistoquímico. **(B)** Análisis cuantitativo del número de células BrdU⁺ en la SGZ de animales R1 y P8 de entre 1 y 14 meses de edad. Tanto los animales R1 como P8 muestran una disminución significativa del número de células BrdU⁺ con la edad ($\Delta\Delta$ $p < 0,01$; $\Delta\#$ $p < 0,01$, respectivamente). Los animales P8 presentan una menor actividad proliferativa que los animales R1 a los 6 meses de edad (* $p < 0,05$). **(C)** Microfotografía confocal coronal representativa del número de células BrdU⁺ (rojo) en la SGZ de animales R1 y P8 de 1, 2, 6, 10 y 14 meses de edad. La tinción nuclear DAPI se muestra en azul. Los datos se muestran como la media \pm E.E.M. $n \geq 4$. Para animales de 2m, $n \geq 10$. Abreviaturas: GCL, capa granular; H, hilus. Barra calibradora en C, 50 μ m.

3.2. Los animales P8 de 2 meses presentan un menor número de NSCs radiales y células SOX2⁺ no radiales en la SGZ, pero ambas poblaciones son proliferativamente más activas que en la cepa control

En la SGZ existen diversas poblaciones celulares con capacidad proliferativa pertenecientes al linaje neurogénico. Por ello, se llevó a cabo un estudio inmunohistoquímico de dichas poblaciones con la finalidad de describir posibles cambios tanto en los números de los distintos tipos de células como en su capacidad proliferativa. En primer lugar, se realizó una inmunofluorescencia contra el factor de

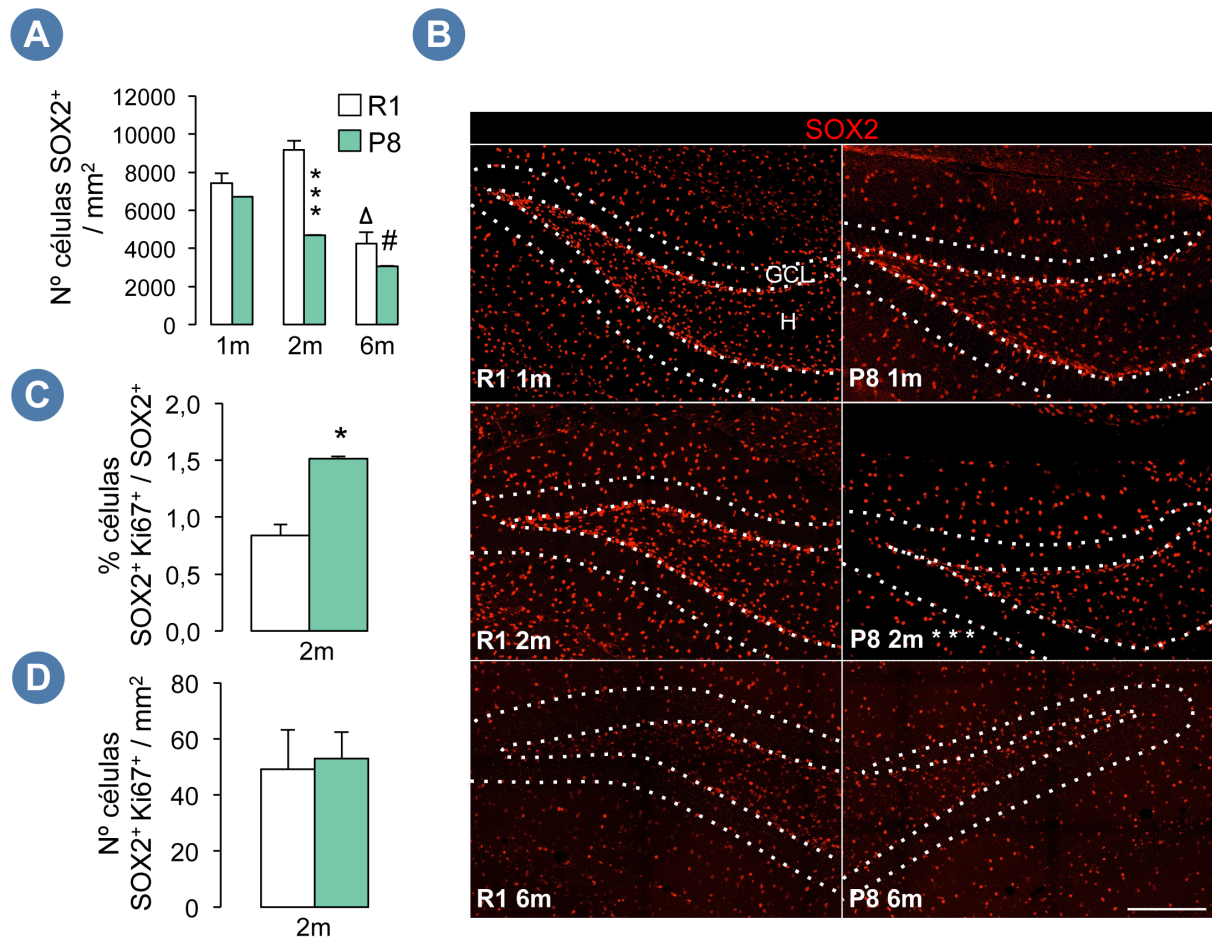


Figura R17. Los animales P8 de 2 meses presenta un menor número de células SOX2⁺ que los R1 a pesar de ser estas más activas a nivel proliferativo que las de los R1. (A) Análisis cuantitativo del número de células SOX2⁺ en la SGZ de animales R1 y P8 de 1, 2 y 6 meses de edad. Los animales P8 de 2 meses muestran un menor número de células SOX2⁺ en comparación con los R1 (***) p < 0,001. Ambas cepas muestran una disminución significativa del número de células positivas con la edad (Δ p < 0,05 en los R1 ; # p < 0,05 en los P8). (B) Microfotografía confocal coronal representativa del número de células SOX2⁺ en la SGZ de animales R1 y P8 de 1, 2 y 6 meses de edad. (C) Representación porcentual del número de células SOX2⁺ en proliferación (Ki67⁺) del total de la población SOX2⁺. Los animales P8 muestran un mayor porcentaje de células SOX2⁺ en proliferación (* p < 0,05). (D) Cuantificación del número de células SOX2⁺ en proliferación en las cepas R1 y P8 a los 2 meses de edad. Ambas cepas presentan valores similares de células SOX2⁺ Ki67⁺. Los datos se muestran como la media ± E.E.M. n ≥ 3. Abreviaturas: GCL, capa granular; H, hilus. Barra calibradora en B, 200 μm.

transcripción SOX2, empleando tejido de animales R1 y P8 de 1, 2 y 6 meses, para identificar tanto la población de NSCs radiales como la población de células SOX2⁺ no radiales, dado que ambos tipos celulares conforman el inicio del linaje neuronal. El análisis estadístico por ANOVA de dos vías (edad y cepa) mostró que tanto la edad, como la cepa, como la interacción de ambas tienen un efecto significativo en el número de células SOX2⁺ ($F_{2,15} = 29,9$, p < 0,001; $F_{2,15} = 27$, p < 0,001; $F_{2,15} = 8,43$, p < 0,05 respectivamente). Se observó una reducción significativa con la edad del número de células SOX2⁺ en la SGZ tanto de animales R1 como P8. Además, se observó que a los 2 meses de edad los animales P8

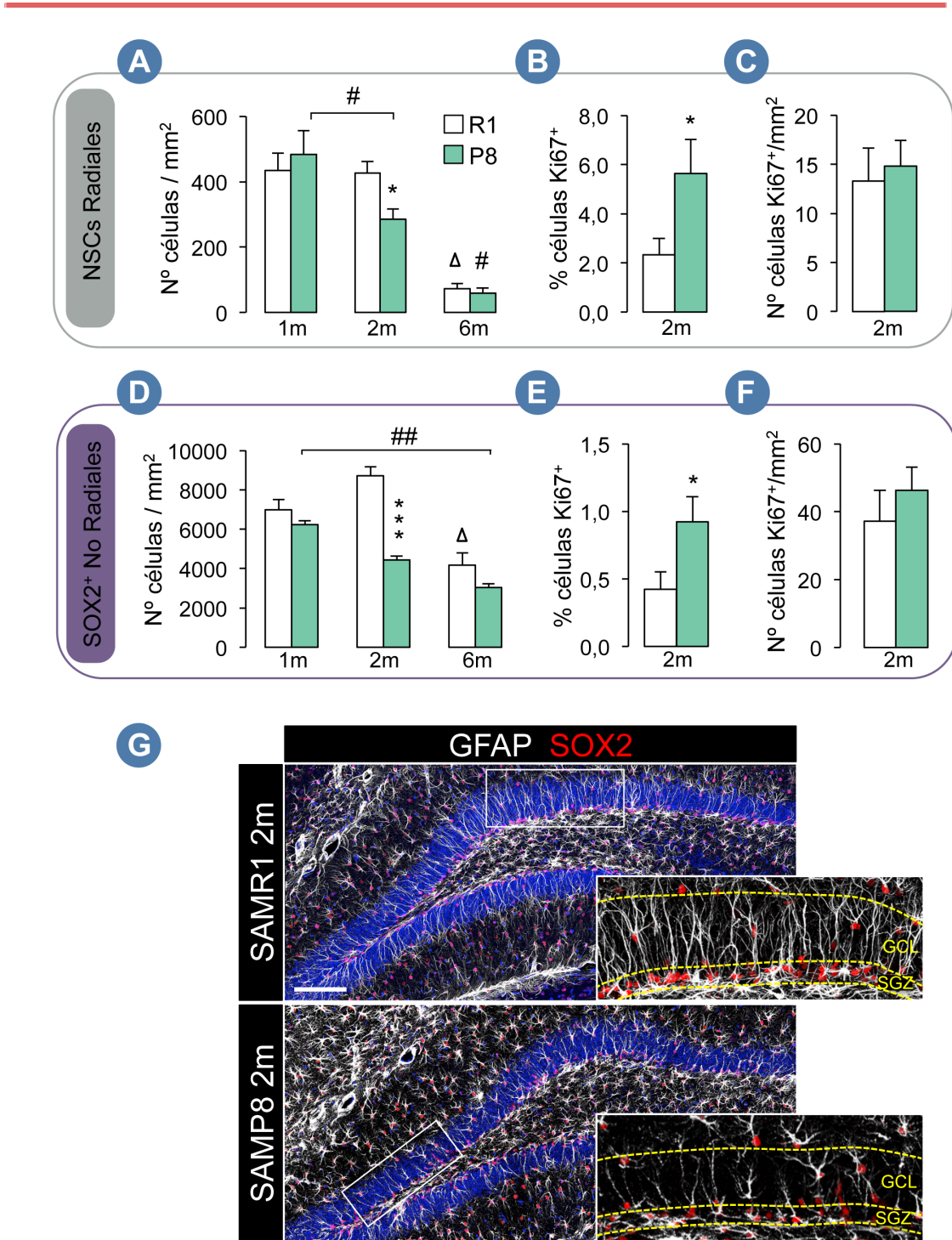
presentan una disminución estadísticamente significativa de la densidad de células SOX2⁺ en la SGZ en comparación con los animales R1 de la misma edad (Figura R 17 A y B, $p < 0,001$).

Adicionalmente, se combinó el marcador SOX2 con Ki67 para estudiar las células precursoras que se encuentran en división, en cualquier fase del ciclo celular. Las células SOX2⁺ de los P8 resultaron ser más activas que las de los R1 ya que un mayor porcentaje de estas estaba en proliferación (Figura R17 C, media \pm EEM: $0,53\% \pm 0,14\%$ en los R1 frente a $1,12\% \pm 0,18\%$ en los P8, $p < 0,05$). No obstante, dado que el número total de células SOX2⁺ fue menor, el aumento en la actividad de estas, no se tradujo en un cambio en el número de células SOX2⁺ Ki67⁺ (Figura R17 D).

Con el objetivo de esclarecer si este efecto se daba en la población de NSCs radiales, en la de SOX2⁺ no radiales o en ambas de forma simultánea, se efectuó una triple inmunofluorescencia contra GFAP/SOX2/Ki67 y se analizó la SGZ, teniendo en cuenta la señal positiva para dichos marcadores además de criterios morfológicos. Se observó que el número de NSCs radiales disminuye con la edad en ambas cepas, sin embargo, a los dos meses, los animales P8 ya presentan una caída más pronunciada y por tanto menor número de NSCs que los R1 de dicha edad (Figura R18 A y G, $p < 0,05$). El análisis de proliferación a los 2 meses mostró nuevamente que las NSCs radiales de los P8 eran más activas a nivel de proliferativo (Figura R18 B, media \pm EEM: $2,33\% \pm 0,68\%$ en los R1 frente a $5,63\% \pm 1,4\%$ en los P8, $p < 0,05$) pero que ambas cepas presentaban el mismo número de NSCs radiales Ki67⁺ (Figura R18 C). Por otro lado y en concordancia con estos datos, se observó una reducción significativa del número de células SOX2⁺ no radiales con la edad, tanto en los animales P8 como en los R1. Además, los animales P8 de 2 meses mostraron un menor número de SOX2⁺ no radiales que los R1 de 2 meses (Figura R18 D y

Figura R18. Los animales P8 de 2 meses presenta un menor número de células NSCs radiales y SOX2⁺ no radiales respecto a los R1 a pesar de ser ambas poblaciones más activas que las de los R1. **(A)** Cuantificación del número de células NSCs radiales (SOX2⁺ GFAP⁺) en la SGZ de animales R1 y P8 de 1, 2 y 6 meses de edad. Los animales P8 de 2 meses muestran un menor número de NSC radiales en comparación con los R1 (* $p < 0,05$). Ambas cepas muestran una disminución significativa del número de células positivas con la edad (Δ $p < 0,05$ en los R1 ; # $p < 0,05$ en los P8). **(B)** Representación porcentual del número de NSCs radiales en proliferación (Ki67⁺) del total de NSCs. Los animales P8 muestran un mayor porcentaje de células NSCs en proliferación (* $p < 0,05$). **(C)** Cuantificación del número de NSCs radiales en proliferación en las cepas R1 y P8 a los 2 meses de edad. Ambas cepas presentan valores similares. **(D)** Cuantificación del número de células SOX2⁺ no radiales de animales R1 y P8 de 1, 2 y 6 meses de edad. Los animales P8 de 2 meses presentan un menor número de SOX2⁺ no radiales en comparación con los R1 (***) $p < 0,001$). Ambas cepas muestran una disminución significativa del número de células positivas con la edad (Δ $p < 0,05$ en los R1 ; ## $p < 0,01$ en los P8). **(E)** Representación porcentual del número de SOX2⁺ no radiales en proliferación (Ki67⁺) del total de SOX2⁺ no radiales. Los animales P8 muestran un mayor porcentaje de células SOX2⁺ no radiales en proliferación (* $p < 0,05$). **(F)** Análisis cuantitativo del número de SOX2⁺ no radiales en proliferación en las cepas R1 y P8 a los 2 meses de edad. No se observan diferencias significativas. **(G)** Microfotografía confocal coronal representativa del número de células NSCs radiales y SOX2⁺ no radiales en la SGZ de animales R1 y P8 de 2 meses de edad. Los datos se muestran como la media \pm E.E.M. $n \geq 3$. Abreviaturas: GCL, capa granular; SGZ, capa subgranular. Barra calibradora en G, 100 μ m.

G, $p < 0,001$). Nuevamente, las células $SOX2^+$ no radiales de los animales P8 volvieron a mostrarse proliferativamente más activas (Figura R18 E, media \pm EEM: $0,42\% \pm 0,23\%$ en los R1 frente a $0,92\% \pm 0,2\%$ en los P8, $p < 0,05$) pero ambas cepas a los 2 meses presentaron el mismo número de células $SOX2^+$ no radiales en ciclo ($Ki67^+$) (Figura R18 F).



Estos datos en su conjunto apuntan a una disminución prematura del número de NSCs radiales y de progenitores no radiales en los animales P8 de 2 meses en comparación con los R1 de la misma edad. Sin embargo, ambas poblaciones presentan una mayor actividad proliferativa en los P8 frente a sus controles a esta edad.

3.3. Estudio de la senescencia y la apoptosis como posibles factores causantes de la pérdida de NSCs en la SGZ de los animales P8 de 2 meses

Algunos procesos celulares como la apoptosis y la senescencia podrían explicar la reducción de la población de NSCs en los animales P8 de 2 meses. Se analizaron los niveles de apoptosis (mediante análisis cuantitativo del marcador Caspasa3 activa) en la SGZ así como la senescencia (mediante tinción contra β -galactosidasa asociada a senescencia SA- β -gal) en la misma región como una de las rutas alternativas a la muerte celular programada. Así, se observó un incremento de los niveles de apoptosis en la SGZ de los animales P8 frente a los animales R1 (Figura R19 A). Dado el estado de las células en apoptosis, no resultó posible colocalizar Caspasa3 activa con marcadores definitorios de tipo celular. En el caso del estudio de senescencia y a pesar de que se observaron células senescentes en la SGZ, éstas células no co-localizaban con el marcaje para el factor de transcripción SOX2 presente en NSCs y SOX2⁺ no radiales (Figura R19 B). Estos datos sugieren que las NSCs y/o células SOX2⁺ no radiales de los animales P8 no entran en senescencia a los 2 meses de edad; sin embargo, existe un mayor número de

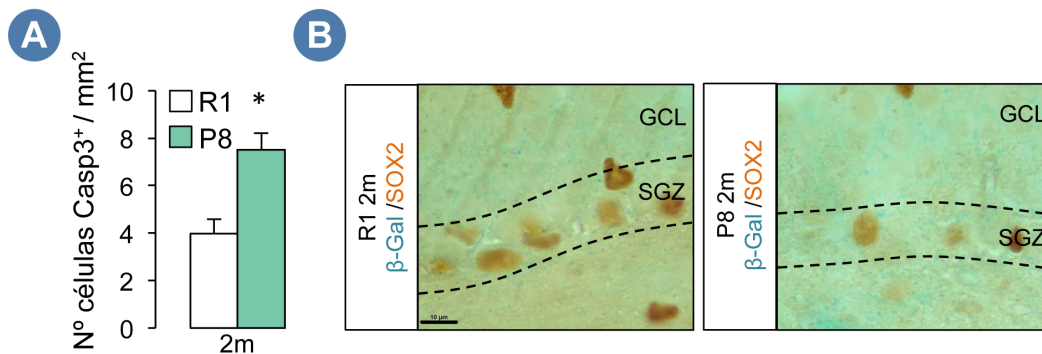


Figura R19. Los animales P8 de 2 meses presentan una mayor tasa de muerte por apoptosis. (A) Cuantificación del número de células Caspasa3⁺ en la SGZ de animales R1 y P8 de 2 meses de edad. Los animales P8 de muestran un mayor número de células Caspasa3⁺ en comparación con los R1 (* $p < 0,05$). **(B)** Microfotografía coronal donde se muestra que las células en senescencia (β -Gal⁺) no colocalizan con el marcador de células indiferenciadas SOX2 ni en animales R1 ni P8 de 2 meses de edad. Los datos se muestran como la media \pm E.E.M. $n \geq 4$. Abreviaturas: GCL, capa granular; SGZ, capa subgranular. Barra calibradora en B, 10 μ m.

células apoptóticas en los animales P8 cuyo fenotipo se desconoce y que podrían corresponder a una mayor apoptosis de las NSCs y SOX2⁺ no radiales, así como también a los neuroblastos o neuronas inmaduras, o incluso a otros tipos celulares presentes en el DG.

3.4. Los animales P8 de 2 meses muestran un elevado número de neuroblastos y de neuronas inmaduras en la SGZ

Dado el menor número de NSCs radiales y células SOX2⁺ no radiales en los animales P8 de 2 meses respecto a los R1, se estudiaron a esta edad posibles alteraciones en poblaciones más diferenciadas. Así, y en contra de lo esperado, se observó que los animales P8 de 2 meses presentaban un mayor número de células DCX⁺ en comparación con los animales control R1 de la misma edad (Figura R20 A y D).

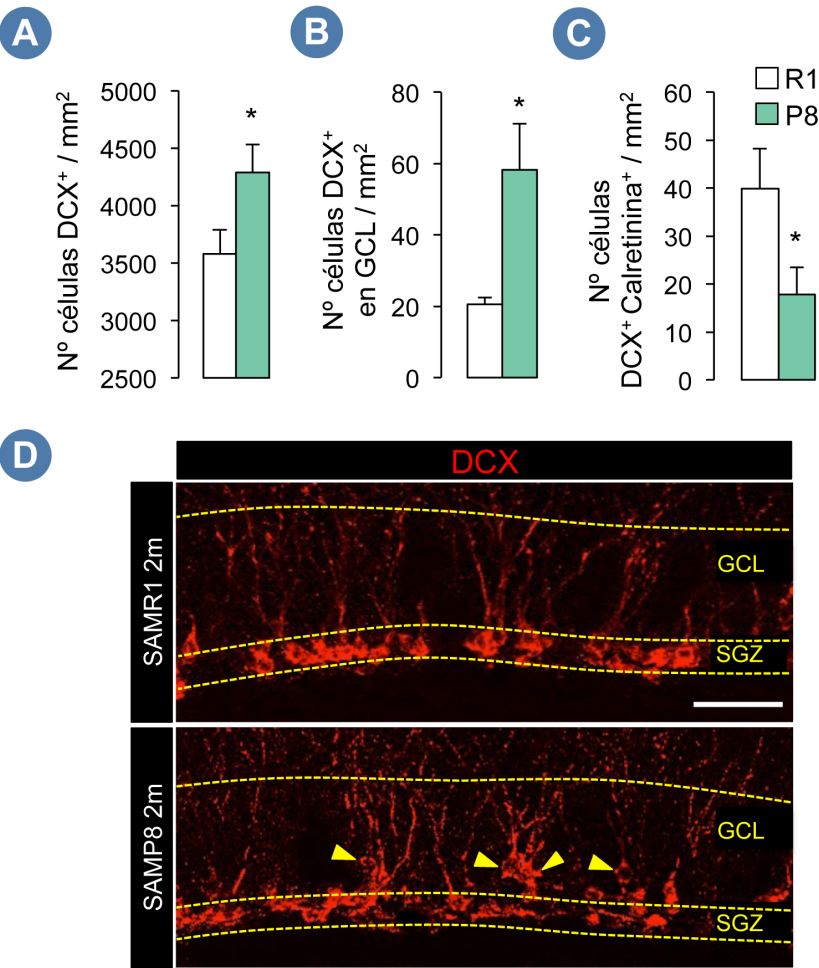


Figura R20. Los animales P8 de 2 meses muestran un elevado número de neuroblastos y neuronas inmaduras. (A) Cuantificación del número de células DCX⁺ en la SGZ de animales R1 y P8 de 2 meses de edad. Los animales P8 de 2 meses muestran un mayor número de células DCX⁺ en comparación con los R1 (* p < 0,05). (B) Análisis cuantitativo del número de células DCX⁺ que se encuentran fuera de la SGZ (en los 2 tercios externos de la GCL) en ambas cepas a los 2 meses. Los animales P8 muestran un incremento en el número de DCX⁺ fuera de su localización habitual en la SGZ (* p < 0,05). (C) Cuantificación del número de células DCX⁺ Calretinina⁺ en animales R1 y P8 de 2 meses de edad. El número de neuronas en proceso de maduración (DCX⁺ Calretinina⁺) es menor en los animales P8 frente a su cepa control R1 (* p < 0,05). (D) Microfotografía confocal coronal representativa del número y localización de células DCX⁺ en la SGZ de animales R1 y P8 de 2 meses de edad. Los datos se muestran como la media ± E.E.M. n ≥ 3. Abreviaturas: GCL, capa granular; SGZ, capa subgranular. Barra calibradora en D, 25 μm.

Además, se encontró una alteración en la posición de las células DCX⁺, puesto que un mayor número de ellas se localizaban en los 2/3 más externos de la GCL en los animales P8 frente a los R1 (Figura R20 B y D). Finalmente, se combinó el análisis de las células DCX⁺ con el marcaje de CALRETININA con la finalidad de estudiar el número de neuronas inmaduras que pasan a un estadio más maduro y post mitótico (células DCX⁺CALRETININA⁺). Se observó así que los animales P8 presentaban un menor número de neuronas inmaduras que están en fase de maduración (Figura R19 C).

Estos datos sugieren que las nuevas neuronas generadas en la SGZ de los animales P8 podrían estar acumulándose y migrando en mayor medida hacia zonas más externas de la GCL, siendo incapaces de continuar con su proceso normal de maduración.

3.5. Análisis de la dinámica y destino celular en la SGZ de los animales P8 de 2 meses frente a las cepas control R1 y C57BL6

Con el objetivo de caracterizar en profundidad las posibles diferencias en la dinámica temporal de la neurogénesis en los animales P8 de 2 meses, se realizó un experimento de pulso-caza en el que los animales fueron inyectados con BrdU una única vez y sacrificados a distintos tiempos. De este modo, y como ya se ha descrito con anterioridad (Kemperman et al., 2004), se puede observar la progresión de las células precursoras a lo largo del linaje neurogénico mediante el seguimiento de las células marcadas con el análogo y la combinación de éste con marcadores específicos de cada estadio de diferenciación celular.

3.5.1. Estudio de la dinámica celular de la cepa control C57BL6

En primer lugar, se llevó a cabo un análisis detallado de la dinámica celular de la SGZ en la cepa control C57BL6 para establecer los tiempos de interés en los que se podrían presentar alteraciones neurogénicas y acotar así el posterior estudio en los P8 y R1. Para ello, se sacrificó a los animales a las 2 horas y 1, 3, 5, 7, 14 y 21 días después de la inyección con BrdU (Figura R21 A). Así, se observó un incremento progresivo del número de células BrdU⁺ entre las 2 horas y el tercer día tras la inyección ($p < 0,05$). Esto indica que una parte sustancial de la población en división volvió a entrar en ciclo celular provocando una acumulación de células marcadas con BrdU a los 3 días de la inyección. Entre los 5 y 7 días se produjo una disminución paulatina del número de células en proliferación. Finalmente, entre los 14 y los 21 días, el número de células positivas para el análogo descendió hasta los niveles observados en los tiempos iniciales de 2 horas y 1 día (Figura R21 B).

A continuación, se hizo un estudio fenotípico de las células BrdU⁺ (Figura R21 C). Como ya estaba descrito, el número de NSCs radiales marcadas con BrdU sufrió un ligero descenso a lo largo de los 21

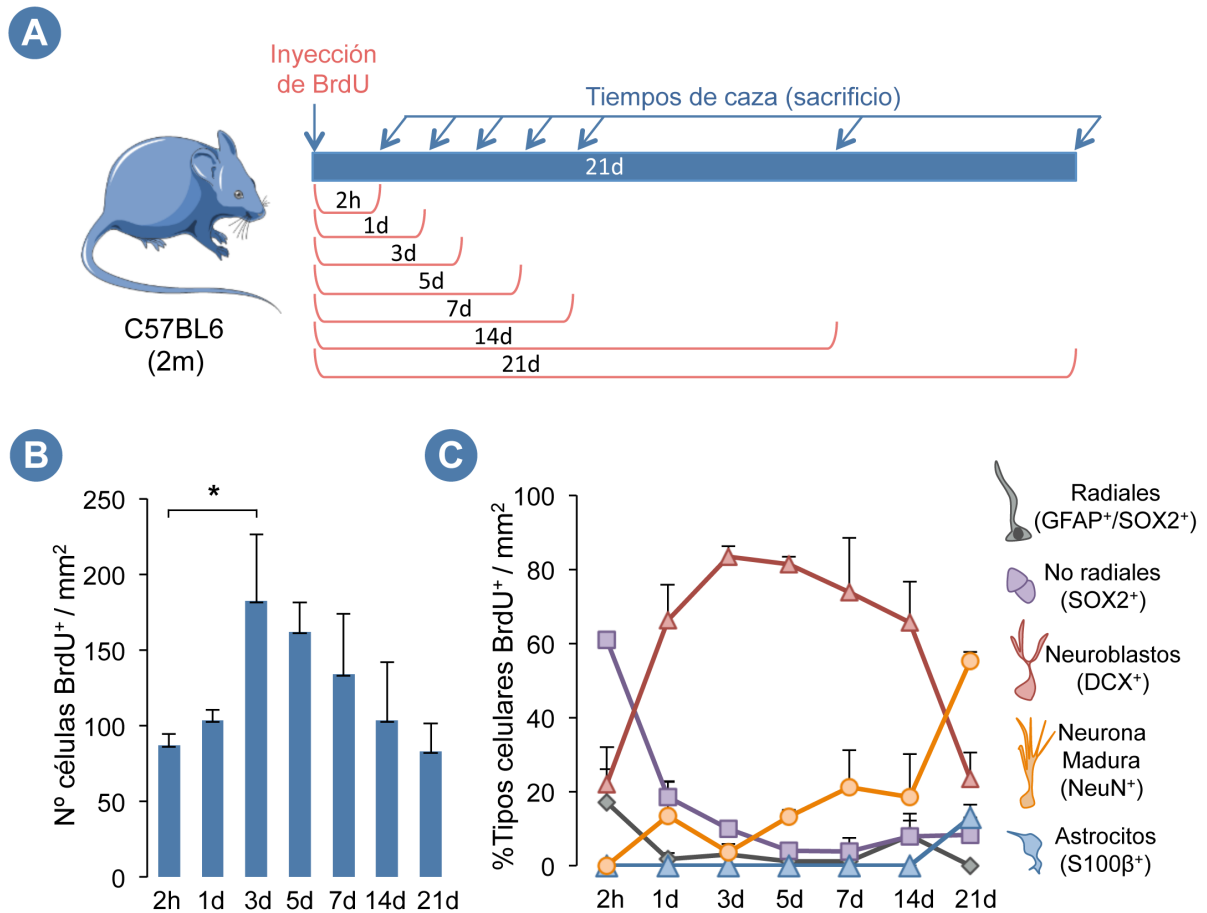


Figura R21. Estudio de la dinámica celular en la SGZ de la cepa control C57BL6. (A) Diagrama representativo del régimen de BrdU administrado a los animales. El análogo se inyectó (50 mg/kg de peso de animal) una única vez y los animales se sacrificaron de forma secuencial a las 2 horas y 1, 3, 5, 7, 14 y 21 días para su posterior análisis inmunohistoquímico. (B) Análisis cuantitativo de la progresión del número de células BrdU⁺ en la SGZ de animales C57BL6 entre las 2 horas y los 21 días de la inyección con BrdU. Se observa un incremento del número de células BrdU⁺ entre las 2 horas y los 3 días tras la inyección (* $p < 0,05$) así como una disminución progresiva del número de células BrdU⁺ con el tiempo. (C) Representación porcentual del inmunofenotipado de las células BrdU⁺ presentes en la SGZ de animales C57BL6 a distintos tiempos tras la inyección de BrdU. Los datos se muestran como la media \pm E.E.M. $n \geq 3$.

días. En el caso de las SOX2⁺ no radiales, se detectó un descenso significativo entre las 2 horas y el día después de la inyección ($p < 0,05$). Dicho descenso se solapa con el incremento en el número de neuroblastos y neuronas inmaduras (DCX⁺/BrdU⁺) ($p < 0,01$). Este hecho, pone de manifiesto la relación precursor-producto existente entre ambas poblaciones. A tiempos más largos, a partir de 5 días, el número de células DCX⁺ se redujo sugiriendo la posible muerte de algunos neuroblastos o neuronas inmaduras pero sobre todo, sugiriendo una maduración de éstas a neuronas granulares (NeuN⁺/BrdU⁺), cuyo número se incrementa también a partir del día 5. Finalmente, a los 21 días, se observó la presencia

de un número reducido de astrocitos maduros ($SOX2^+/BrdU^+$) (media \pm EEM: 13,08% \pm 3,41%). Esto indica que dichos astrocitos proceden probablemente de NSCs radiales que, según un estudio reciente (Encinas et al., 2011), tras varias rondas de división se diferencian definitivamente a astrocitos maduros.

3.5.2. Estudio de la dinámica celular de las cepas R1 y P8.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos en la cepa control C57BL6, se seleccionaron los puntos de 2h y 1, 3 y 21 días para el estudio de las cepas R1 y P8 a los 2 meses (Figura R22 A). Los tiempos de 2 horas, 1 día y 3 días se seleccionaron dado que abarcan la progresión inicial de las distintas poblaciones de células $SOX2^+$ así como el pico proliferativo más alto del proceso neurogénico. Por su parte, el tiempo de 21 días se seleccionó dada la aparición de células diferenciadas y maduras no sólo del linaje neuronal si no también astrocitario, y que por tanto podría aportar datos del destino de las NSCs radiales en los animales P8. En primer lugar, se observó cómo de la misma manera que los animales de la cepa C57BL6, los animales R1 y P8 a los 3 días de la inyección de BrdU mostraron un incremento significativo de dicha marca (Figura R22 B, $p<0,01$). Sin embargo, los animales P8, que presentaban a las 2 horas el mismo número de células $BrdU^+$ que los animales R1, a los 3 días presentaban un número de células $BrdU^+$ significativamente más bajo que los animales R1 (Figura R22 B, $p<0,05$). De forma similar a lo descrito en la cepa C57BL6, tanto los animales R1 como los P8, mostraron un descenso en el número de células marcadas con BrdU desde el pico de 3 días a los 21 días de su inyección ($p<0,01$ y $p<0,05$ respectivamente), situándose en este caso incluso por debajo de los niveles detectados a 2 horas.

El posterior estudio fenotípico de las poblaciones marcadas con BrdU a las 2h, 1d y 3d mostró que la cepa P8 no presenta diferencias significativas en la progresión de los niveles de NSCs radiales $BrdU^+$ ni $SOX2^+$ no radiales $BrdU^+$ en comparación con los animales R1 (Figura R22 C y D). Las NSCs radiales disminuyeron en número en ambas cepas entre 1 y 3 días ($p<0,01$), al igual que las $SOX2^+$ no radiales ($p<0,01$), dada su diferenciación hacia neuroblasto. De este modo, no se observan alteraciones en la dinámica de las NSCs radiales ni de las $SOX2^+$ no radiales en los animales P8.

Por otro lado, se calculó la tasa de proliferación para ambas poblaciones a las 2h de la inyección con BrdU (n° células $BrdU^+$ / n° células total) . Esta tasa tiende a ser ligeramente superior en las NSCs de los animales P8 frente a los R1, aunque las diferencias no son significativas (media \pm EEM: 4,16% \pm 0,23% en los R1 frente a 5,59% \pm 1,24% en los P8). La tasa si es significativamente mayor en la población de células $SOX2^+$ no radiales de los animales P8 frente a los R1 (media \pm EEM: 0,67% \pm 0,09% en los R1 frente a 1,26% \pm 0,08% en los P8, $p<0,001$). Estos datos concuerdan con los mayores porcentajes de proliferación observados en las NSCs radiales y $SOX2^+$ no radiales en los animales P8 analizadas con el marcador Ki67 (Figura R18 C y F).

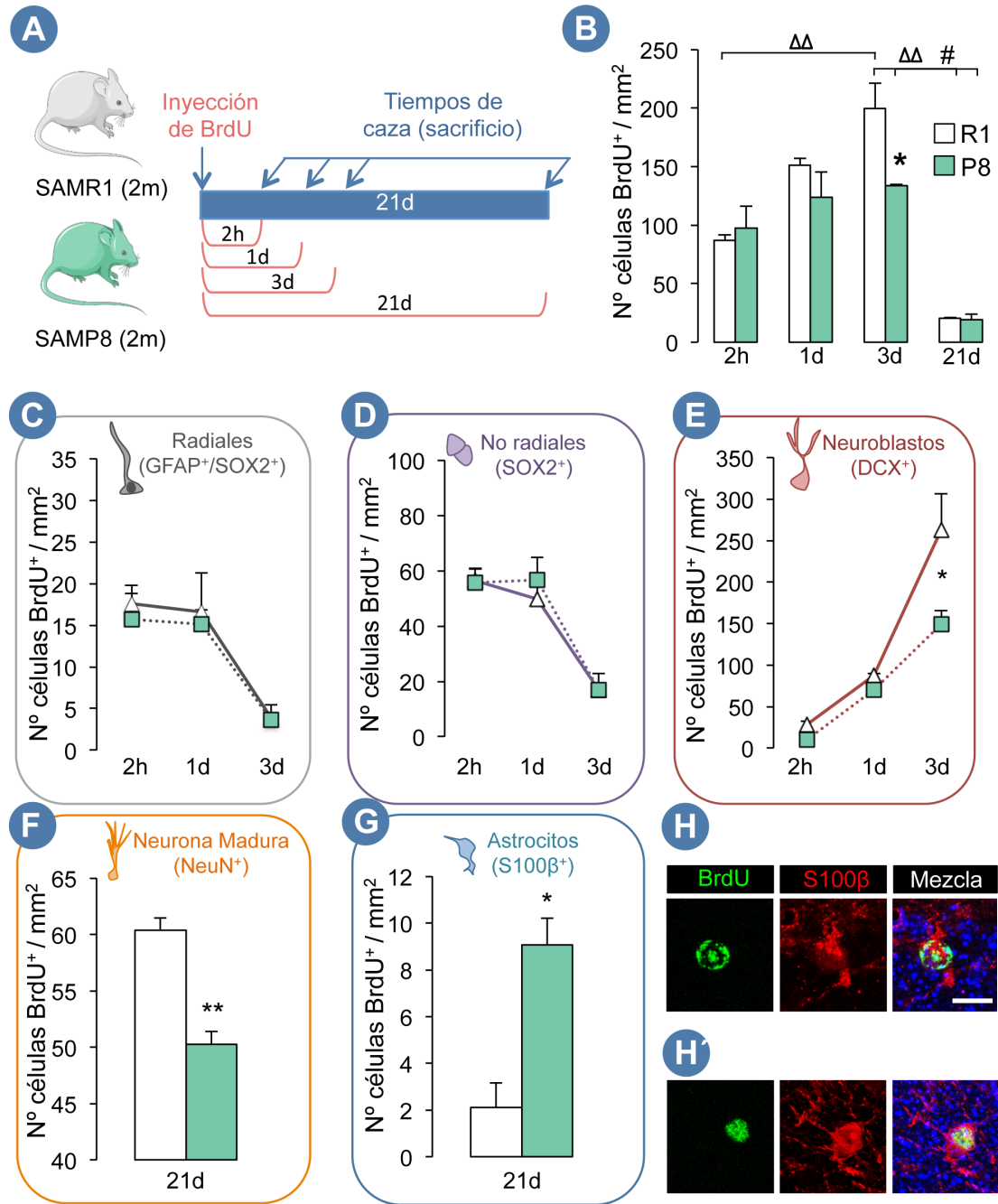


Figura R22. Estudio de la dinámica celular en la SGZ de las cepas R1 y P8. (A) Diagrama representativo del régimen de BrdU administrado a los animales R1 y P8 de 2 meses de edad. El análogo se inyectó (50 mg/kg de peso de animal) una única vez y los animales se sacrificaron de forma secuencial a las 2 horas y 1, 3 y 21 días para su posterior análisis inmunohistoquímico. (B) Análisis cuantitativo de la progresión del número de células BrdU⁺ en la SGZ de animales R1 y P8 entre las 2 horas y los 21 días de la inyección con BrdU. Los animales R1 muestran un incremento del número de células BrdU⁺ entre las 2 horas y los 3 días tras la inyección ($\Delta\Delta$ $p < 0,01$) que no se observa en los animales P8. Ambas cepas disminuyen significativamente el número de células BrdU⁺ con el tiempo ($\Delta\Delta$ $p < 0,01$ en los R1; # $p < 0,05$ en los P8). (C-E) Análisis cuantitativo del número de células BrdU⁺ que presentaron entre las 2 horas y los 3 días fenotipo de NSCs radiales (C), SOX2⁺ no radiales (D) y DCX⁺ (E). Los animales P8 presentan una menor producción de células DCX⁺ a los 3 días de la inyección con el análogo. (F-G) Análisis cuantitativo del número de células BrdU⁺ que presentaron a los 21 días fenotipo de neurona madura (F) y astrocyto maduro (G). Los animales P8 generan más astrocitos maduros (* $p < 0,05$) pero menos neuronas maduras (** $p < 0,01$) que los R1. (H, H') Microfotografía confocal que muestra el marcaje BrdU⁺ (verde) y S100β⁺ (rojo) de los astrocitos maduros de los animales P8 a los 21 días de la inyección con el análogo. Los datos se muestran como la media \pm E.E.M. $n \geq 4$. Barra calibradora en H y H', 10 μ m.

El estudio de la población de neuroblastos y neuronas inmaduras, mostró un mismo número de células doble positivas ($DCX^+/BrdU^+$) a las 2 horas y 1 día tanto en animales R1 como en animales P8. Sin embargo, a los 3 días, el número de neuroblastos y neuronas inmaduras marcados con BrdU de los animales P8 fue significativamente inferior al mostrado por los animales R1 (Figura R22 E, $p < 0,05$). La tasa de proliferación de esta población, calculada en base a la incorporación de BrdU a las 2h, resultó significativamente menor en los animales P8 frente a los R1 (media \pm EEM: $1,02\% \pm 0,2\%$ en los R1 frente a $0,27\% \pm 0,1\%$ en los P8, $p < 0,05$). Estos datos, apuntan a una menor capacidad de proliferación de la población DCX^+ en los animales P8 de 2 meses.

Por último, se analizó el destino que presentaban las células $BrdU^+$ a los 21 días de la inyección con el análogo (Figura R22 F y G). Así, se observó cómo los animales P8 presentaron un menor número de células diferenciadas a neurona granular madura en comparación con los animales R1 (Figura R22 F, $p < 0,05$). Por el contrario, los animales P8 mostraron un mayor número de células con marcaje de astrocito maduro en comparación con los animales R1 (Figura R22 G, H y H', $p < 0,05$).

3.6. Caracterización de las moléculas de señalización que regulan la actividad de las NSCs y su progenie en la SGZ de los animales P8 de 2 meses

3.6.1. Los animales P8 de 2 meses presentan un incremento en la SGZ de la expresión de genes relacionados con la activación de la vía de BMPs

Las BMPs llevan a cabo un importante papel regulador en la SGZ (Bonaguidi et al., 2008; Mira et al., 2010) y presentan alteraciones en modelos genéticos de la EA (Crews et al., 2010; Li et al., 2008). Además, numerosos estudios apuntan a una función astrogliogénica de las BMPs en estadios posnatales (Gomes et al., 2003; Gratacòs et al., 2002). En base a esto, se llevó a cabo un análisis de expresión génica por qRT-PCR de diversos genes que codifican para proteínas implicadas en la vía de señalización de BMPs (Figura R23 A), incluyendo tanto ligandos, como receptores y antagonistas. Se observó cómo, de todos los genes analizados, los animales P8 presentaban una sobreexpresión significativa de los ligandos *Bmp4* y *Bmp6* a los 2 meses de edad en comparación con los R1 de la misma edad (Figura R23 A y B, $p < 0,01$ y $p < 0,05$ respectivamente). Mientras que los animales R1 muestran un nivel de expresión similar de dichos genes durante el envejecimiento, los P8 sufren una caída drástica de la expresión con la edad y se igualan a los R1 a los 10 meses de edad (Figura R23 A y B, *Bmp4* $p < 0,01$ y *Bmp6* $p < 0,05$). Por el contrario, se observó una sobreexpresión del antagonista *Noggin* con la edad en los animales R1 ($\Delta p < 0,05$) mientras que los animales P8 ($p < 0,05$) mantuvieron una expresión constante (Figura R23 A y B).

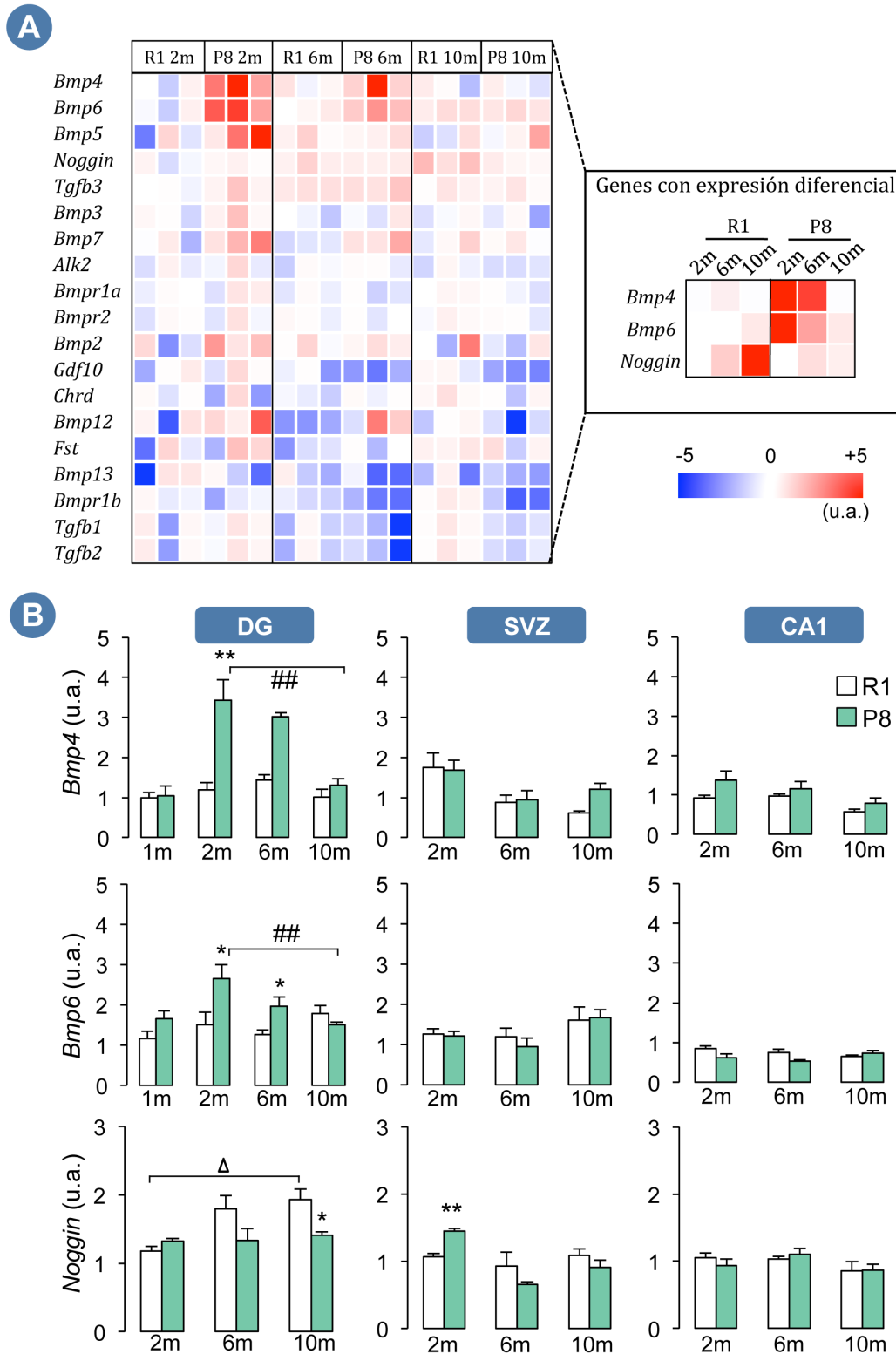


Figura R23. Los animales P8 de 2 meses presentan un incremento de la expresión de genes relacionados con la activación de la vía de BMPs. **(A)** Análisis mediante RT-qPCR y representación a modo de “mapa de calor” del nivel de expresión de genes relacionados con la vía de BMPs en el DG de animales R1 y P8 de 2, 6 y 10 meses de edad. Panel de la izquierda, cada columna corresponde a los valores de expresión de un animal. Panel de la derecha, cada columna corresponde al promedio de tres animales. Los animales P8 muestran una mayor expresión de los genes *Bmp4* y *Bmp6* a los 2 meses de edad en comparación con los R1 de la misma edad. Los animales R1 muestran un incremento de la expresión génica de *Noggin* con la edad que no se observa en los animales P8. **(B)** Análisis mediante RT-qPCR del nivel de expresión de genes relacionados con la vía de BMPs en el DG, SVZ y CA1 de animales R1 y P8 de 1, 2, 6 y 10 meses de edad. Los animales P8, de 2 meses de edad, muestran un incremento de la expresión de los genes *Bmp4* y *Bmp6* específico del DG (** $p < 0,01$ para *Bmp4*; * $p < 0,05$ para *Bmp6*). En la SVZ, los animales P8 de 2 meses presentan un incremento significativo de la expresión génica de *Noggin* con respecto a la SVZ de animales R1. Los datos se muestran como la media \pm E.E.M. $n \geq 4$. Abreviaturas: DG, giro dentado; SVZ, zona subventricular; CA1, cornu ammonis 1.

Para analizar la posibilidad de que los niveles de expresión de las BMPs fuesen más altos en los animales P8 de forma inherente a la cepa, se llevó a cabo un estudio de expresión génica de ambos genes a edades más tempranas (1 mes). Sin embargo, se observó que la expresión génica de *Bmp4* y *Bmp6*, no presentaba diferencias significativas entre las cepas R1 y P8 (media \pm EEM: $0,99 \pm 0,13$ u.a. en los R1 frente a $1,04 \pm 0,25$ u.a. en los P8 para *Bmp4*; $1,17 \pm 0,17$ u.a. en los R1 frente a $1,65 \pm 0,2$ u.a. en los P8 para *Bmp6*). Sí se observó para ambos genes un aumento significativo en la expresión entre los animales P8 de 1 y 2 meses (*Bmp4*, $p < 0,01$; *Bmp6*, $p < 0,05$).

Además, se analizó la expresión génica de *Bmp4*, *Bmp6* y *Noggin* en la región de la SVZ y en la CA1 para determinar si las alteraciones en la expresión eran específicas del DG. Ni *Bmp4* ni *Bmp6* mostraron diferencias de expresión entre ambas cepas ni en la SVZ ni en CA1, siendo esta expresión únicamente diferencial en el DG de los P8 a los 2 y 6 meses. En el caso de *Noggin*, éste presenta una mayor expresión en la SVZ de animales P8 de 2 meses frente a los R1 de la misma edad ($p < 0,01$) y no presenta variaciones en la CA1 de ambas cepas (Figura R23 B).

Estos datos en su conjunto muestran una alteración en la expresión de varios genes de la vía de señalización de BMPs. Esta alteración se basa en el incremento transitorio de la expresión génica de *Bmp4* y *Bmp6* en el nicho de la SGZ. Este incremento de la expresión parece observarse de manera específica en la SGZ, que presenta importantes diferencias con los perfiles de expresión observados en la SVZ. Así, la vía de señalización de las BMPs se presenta como una posible efectora de los cambios en la actividad de las NSCs y la neurogénesis en animales P8 jóvenes.

3.6.2. Los animales P8 de 2 meses presentan niveles elevados de proteína BMP6 madura en el DG

Con la finalidad de correlacionar el aumento de expresión génica en el DG de animales P8 jóvenes con un aumento en la expresión a nivel de proteína de BMP4 y BMP6, se analizó tanto la expresión de la proteína precursora como de la forma madura para ambas cepas a los 2 meses de edad. Los animales P8 mostraron los mismos niveles de proteína precursora BMP4 y BMP6 (Figura R24 A y B). Sin embargo, se observó una expresión significativamente mayor de BMP6 madura en los animales P8 frente a los animales R1 (Figura R24 A y C, $p < 0,05$). Además, se observó un incremento de SMAD1/5/8 fosforilada en el DG de los animales P8 frente a los R1, lo que apunta a una mayor activación de la vía canónica de las BMPs en los animales P8 (Figura R24 A y D, $p < 0,05$).

3.6.3. BMP6 induce la gliogénesis en cultivos de células madre hipocampales adultas.

Para tratar de relacionar la sobreexpresión de BMP6 y la mayor actividad de la vía de las BMPs en el DG de los animales P8 con las alteraciones mostradas en el proceso neurogénico por dichos animales, se

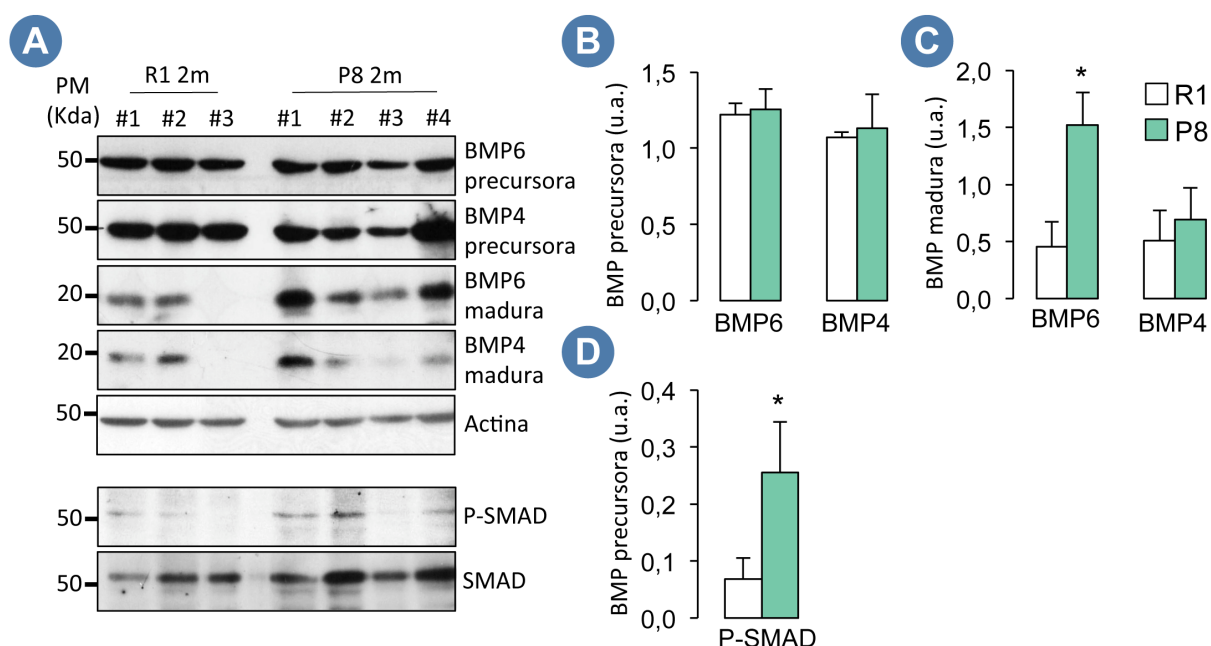


Figura R24. Los animales P8 de 2 meses presentan niveles elevados de proteína BMP6 madura en el DG. **(A)** Detección por western blot de las proteínas BMP4 y BMP6 precursoras y maduras así como de la fracción SMAD 1/5/8 activa, fosforilada (P-SMAD) en el DG de animales R1 y P8 de 2 meses. Como controles se empleó ACTINA y SMAD total (1/5/8). **(B)** Análisis por densitometría de las bandas de western blot que muestra la cantidad relativa de BMP4 y BMP6 precursoras presentes en el DG de animales R1 y P8 de 2 meses. No se aprecian diferencias significativas entre ambas cepas. **(C)** Análisis por densitometría de la cantidad relativa de BMP4 y BMP6 maduras en el DG de animales R1 y P8 de 2 meses. Los animales P8 presentan niveles más altos de BMP6 madura en comparación con los R1 (* $p < 0,05$). **(D)** Análisis por densitometría de la cantidad relativa de P-SMAD en el DG de animales R1 y P8 de 2 meses. Los animales P8 presentan una mayor activación de la vía de BMPs medida a través del incremento en SMAD 1/5/8 fosforilada (P-SMAD) respecto a SMAD total (* $p < 0,05$). Los datos se muestran como la media \pm E.E.M. $n \geq 3$. Abreviaturas: DG, giro dentado.

llevó a cabo un estudio *in vitro*. Se añadió BMP6 (50 ng/mL) a células madre hipocámpales de rata (HC7) para estudiar su efecto en condiciones de diferenciación (ausencia de mitógenos). Se observó cómo la presencia de BMP6 en el medio inducía un incremento significativo en el número de astrocitos GFAP⁺ (Figura R25 A y B, $p < 0,001$) pero no en el número de neuronas β III TUBULINA⁺. Este incremento apunta a un papel pro-astroglógico de BMP6 en la SGZ adulta.

3.7. Inhibición *in vivo* de la vía de BMPs en el DG mediante la infusión de Noggin en los animales P8 de 2 meses

3.7.1. La inhibición de la vía de BMPs incrementa el número de NSCs radiales así como su proliferación en animales P8 de 2 meses

Para confirmar la posibilidad de que el incremento en la señalización por BMP6 en los animales P8 de 2 meses pudiese estar implicado en la pérdida de NSCs radiales, se administró Noggin en el ventrículo

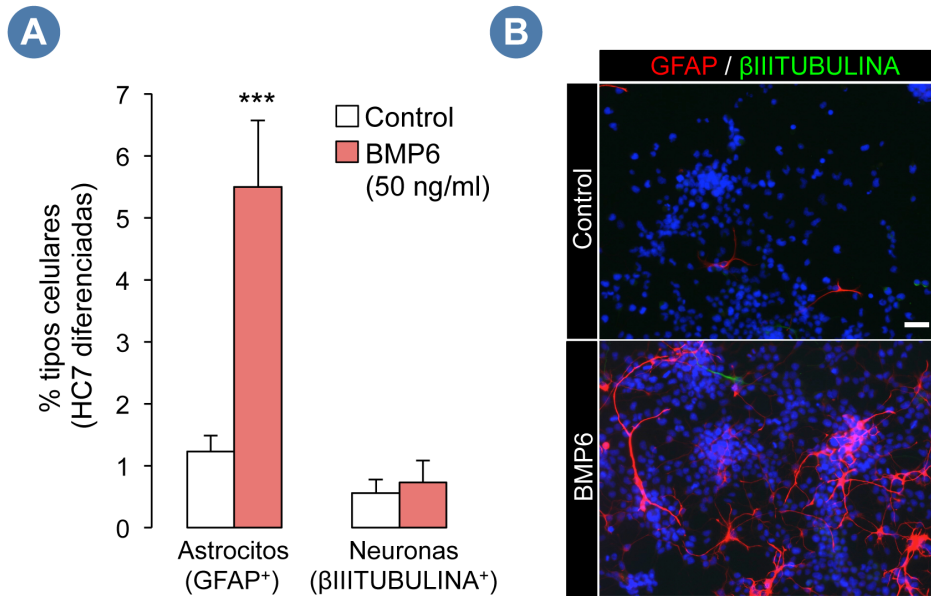


Figura R25. BMP6 induce gliogénesis en cultivos de células madre de hipocampo de ratas adultas (línea celular HC7). (A) Representación porcentual del análisis por inmunofluorescencia del fenotipo que adquieren las HC7, en condiciones de diferenciación, en presencia y ausencia de BMP6 exógeno. Las HC7 en presencia de BMP6 muestran un incremento significativo del número de astrocitos (GFAP⁺) generados en comparación con las células sin tratar (***) $p < 0,001$. Sin embargo, el número de neuronas (βIII TUBULINA⁺) generado es el mismo que en condiciones control. El número de células se determinó por el recuento de los núcleos marcados con DAPI. (B) Microfotografía representativa del incremento en astrocitos en presencia de BMP6 frente a la condición control. Los datos se muestran como la media \pm E.E.M. $n \geq 3$. Barra calibradora en B, 30 μ m.

lateral de ratones R1 y P8 de dicha edad durante una semana. En el sexto día de infusión, se administró BrdU a los animales y se les sacrificó 3 días después de la inyección con el análogo (Figura R26 A). La inhibición de la vía de las BMPs, provocó un incremento significativo en el número total de células SOX2⁺ en los animales P8 tratados con Noggin frente a los animales P8 tratados con vehículo (media \pm EEM: 2750 \pm 382 células/mm² en los P8 salino frente a 3833 \pm 333 células/mm² en los P8 Noggin, $p < 0,05$), sin embargo, este aumento no llegó a los niveles mostrados por los animales R1 tanto tratados con salino como tratados con Noggin (media \pm EEM: 5375 \pm 875 células/mm² en los R1 salino y 5000 \pm 250 células/mm² en los R1 Noggin, sin diferencias significativas, dato no mostrado en la figura).

Con el objetivo de analizar en profundidad el rescate parcial en el número total de células SOX2⁺ de la SGZ, se combinó nuevamente el marcaje de SOX2 con la inmunotinción para GFAP y Ki67. En el caso de las NSCs radiales, se observó un incremento significativo en la densidad de NSCs radiales en los animales P8 tratados con Noggin frente a los animales de la misma cepa tratados con suero salino (Figura R26 B y H, $p < 0,01$).

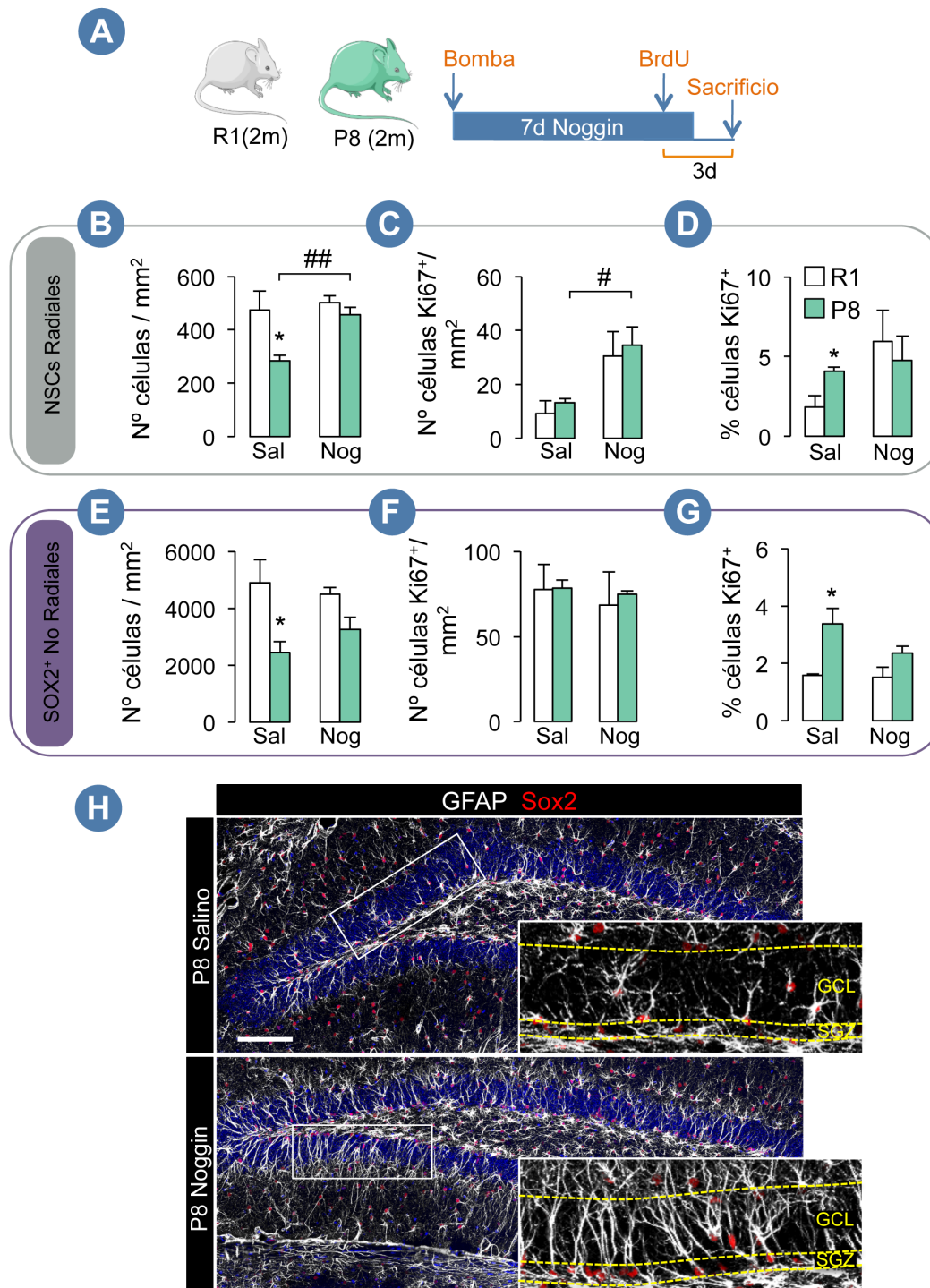


Figura R26. La inhibición de la vía de BMPs mediante la infusión de Noggin, aumenta el número de NSCs y su proliferación en animales P8 de 2 meses. **(A)** Diagrama representativo del régimen de BrdU administrado a los animales en relación al periodo de infusión de suero salino o Noggin. El periodo de infusión de la bomba fue de 7 días. Los animales se inyectaron con BrdU una única vez en el sexto día de infusión de la bomba y se sacrificaron 3 días después. **(B)** Cuantificación del número de células NSCs radiales ($SOX2^+ GFAP^+$) en la SGZ de animales R1 y P8 de 2 meses de edad tras la infusión con suero salino (control) o con Noggin. Los animales P8 muestran un incremento en el número de NSCs radiales tras el tratamiento con el antagonista Noggin en comparación con los animales infundidos con salino ($## p < 0,01$). **(C)** Cuantificación del número de NSCs radiales en proliferación en las cepas R1 y P8 a los 2 meses de edad tras la infusión con salino o con Noggin. Ambas cepas presentan un incremento en el número de NSCs en proliferación ($Ki67^+$) ($\# p < 0,05$). **(D)** Representación porcentual del número de NSCs radiales en proliferación ($Ki67^+$) del total de NSCs. Los animales R1 y P8 muestran tasas de proliferación similares tras el tratamiento con Noggin. **(E)** Cuantificación del número de células $SOX2^+$ no radiales de animales R1 y P8 de 2

meses de edad tras la infusión con suero salino (control) o con Noggin. Los animales P8 muestran un ligero incremento (no significativo) en el número de células $SOX2^+$ no radiales tras el tratamiento con el antagonista Noggin. **(F)** Análisis cuantitativo del número de $SOX2^+$ no radiales en proliferación en las cepas R1 y tras la infusión con salino o con Noggin. No se observan diferencias significativas entre los animales tratados y los controles. **(G)** Representación porcentual del número de $SOX2^+$ no radiales en proliferación ($Ki67^+$) del total de $SOX2^+$ no radiales en animales infundidos con salino o con Noggin. Los animales P8 muestran valores similares a los R1 tras ser infundidos con Noggin. **(H)** Microfotografía confocal coronal representativa del número de células NSCs radiales y $SOX2^+$ no radiales en la SGZ de animales P8 de 2 meses infundidos con salino o con Noggin. Los datos se muestran como la media \pm E.E.M. $n = 2$ para los R1, $n \geq 3$ para los P8. Abreviaturas: GCL, capa granular; SGZ, capa subgranular. Barra calibradora en G, 100 μm .

De hecho, la densidad de NSCs radiales en los P8 tratados con Noggin alcanzó los niveles de los R1. Los animales R1 por el contrario no sufrieron variaciones en presencia del antagonista Noggin (Figura R26 B). En cuanto a los niveles de NSCs radiales en proliferación, Noggin incrementó su número en los P8 (Figura R26 C, $p < 0,05$) del mismo modo que en los R1 y que en los Crl:CD1, como ya se había descrito anteriormente (Mira et al., 2010). No se observaron diferencias entre R1 y P8 en cuanto a la tasa de proliferación de las NSCs en presencia de Noggin (Figura R26 D, media \pm EEM: $6 \pm 1,9\%$ en los R1 Noggin y $4,8 \pm 1,5\%$ en los P8 Noggin, sin diferencias significativas).

Por otro lado, el tratamiento con Noggin no tuvo un efecto marcado sobre la población de células $SOX2^+$ no radiales acorde con lo ya descrito anteriormente (Mira et al., 2010). No obstante, las diferencias entre R1 y P8 observadas tanto en salino como en condiciones basales (Figura R18 D) dejaron de ser significativas.

En conjunto, estos datos apuntan a la implicación de la vía de las BMPs en la reducción del número de NSCs radiales mostrada por los animales P8 jóvenes. La inhibición de esta vía resulta en un claro rescate de dicha población así como en un incremento selectivo de su proliferación, además de en una leve recuperación de la población de $SOX2^+$ no radiales.

3.7.2. La inhibición de la vía de BMPs reduce el número de neuroblastos y neuronas inmaduras en animales P8 de 2 meses

Dado que la vía de las BMPs demostró estar implicada en la regulación del número de NSCs radiales en los animales P8, se analizaron las posibles implicaciones de esta vía en las alteraciones de los neuroblastos y neuronas inmaduras mostradas por los P8 en estado basal. Así, se observó nuevamente que los animales P8 tratados con salino presentaban un mayor número de células DCX^+ que los animales R1 tratados del mismo modo (Figura R27 A, $p < 0,05$). Sin embargo, los animales P8 redujeron significativamente su inmunoreactividad para DCX ($p < 0,05$). De este modo, los animales P8 tratados con Noggin mostraron los mismos números de células DCX^+ que los R1 también tratados con Noggin (Figura R27 A).

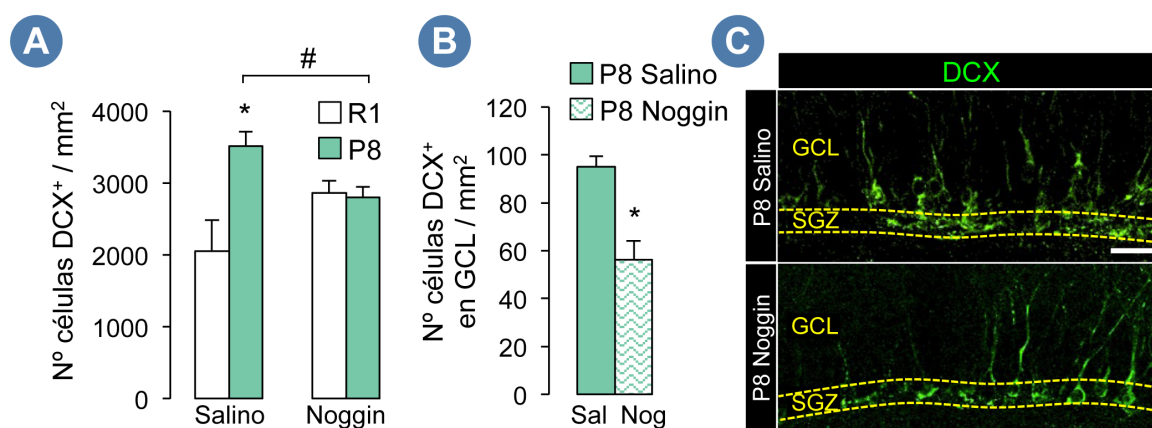


Figura R27. La inhibición de la vía de BMPs reduce el número de neuroblastos y neuronas inmaduras en animales P8 de 2 meses. **(A)** Cuantificación del número de células DCX⁺ en la SGZ de animales R1 y P8 de 2 meses infundidos con suero salino o con Noggin. Los animales P8 infundidos con Noggin muestran una reducción en el número de células DCX⁺ en comparación con los animales infundidos con suero (# p < 0,05), que hace que desaparezcan las diferencias observables entre los animales R1 y P8 infundidos con suero (* p < 0,05). **(B)** Análisis cuantitativo del número de células DCX⁺ que se encuentran fuera de la SGZ (en los 2 tercios externos de la GCL) en los animales P8 tratados con salino o con Noggin. Los animales P8 tratados con Noggin muestran una reducción en el número de DCX⁺ fuera de su localización habitual en la SGZ (* p < 0,05). **(C)** Microfotografía confocal coronal representativa del número y localización de células DCX⁺ en la SGZ de animales P8 de 2 meses tratados con salino o con Noggin durante una semana. Los datos se muestran como la media ± E.E.M. n = 2 para los R1, n ≥ 3 para los P8. Abreviaturas: GCL, capa granular; SGZ, capa subgranular. Barra calibradora en D, 25 µm.

Por otro lado, se observó una reducción significativa en el número de neuroblastos y neuronas inmaduras en los 2 tercios más externos de la GCL en los animales P8 tratados con Noggin frente a los tratados con salino (Figura R27 B y C, p<0,05).

3.8. Análisis de la dinámica y destino celular en la SGZ de los animales P8 de 2 meses tratados con Noggin

Con el objetivo de estudiar la implicación de la vía de las BMPs en la desregulación de la dinámica y destino celular de las NSCs radiales en P8 de 2 meses, se llevó a cabo un estudio de pulso-caza tras la infusión de Noggin. En este caso, se estudiaron los tiempos de 3 y 21 días tras la inyección con BrdU dado que fueron los tiempos donde se encontraron alteraciones en los P8 respecto a los R1 (Figura R28 A).

A los 3 días tras la inyección de BrdU, el tratamiento con Noggin no produjo diferencias significativas ni en el número de células BrdU⁺ (Figura R28 B) ni en el número de células DCX⁺/BrdU⁺ en comparación con los P8 control (media ± EEM: 96,2 ± 38 cel/mm² en los P8 Salino y 117,5 ± 14 en los P8 Noggin, sin diferencias significativas). A los 21 días de la inyección con BrdU, los animales infundidos con Noggin

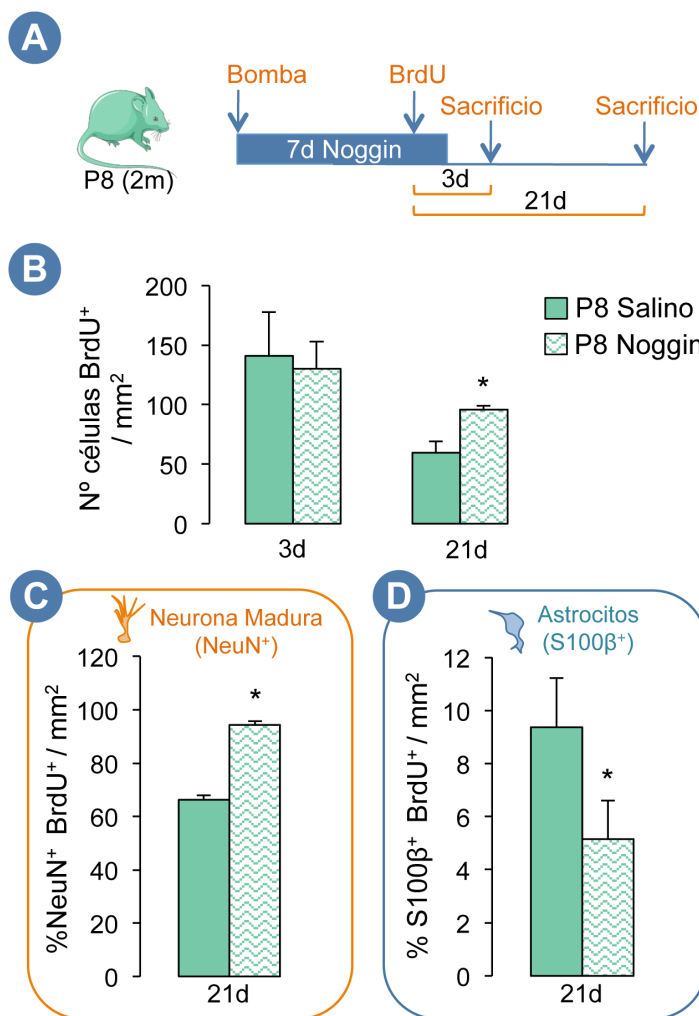
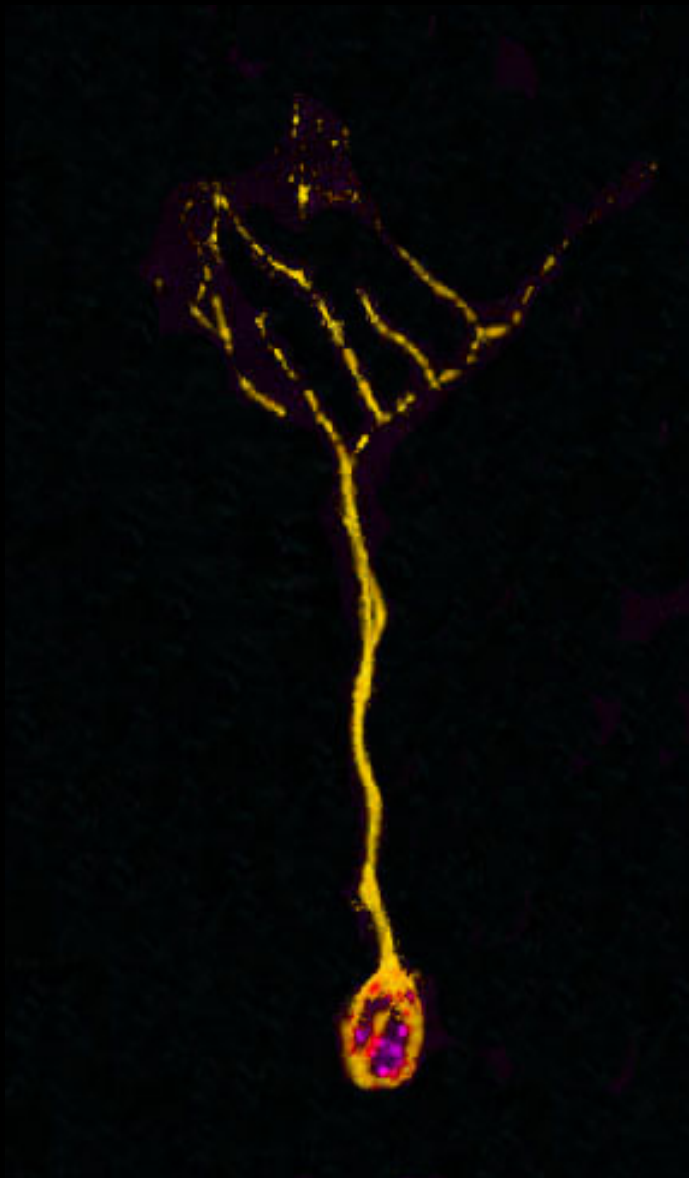


Figura R28. Estudio de la dinámica celular en la SGZ de los animales P8 tras la infusión de suero salino o Noggin. (A) Diagrama representativo del régimen de BrdU administrado a los animales P8 en relación al periodo de infusión de suero salino o Noggin. El periodo de infusión de la bomba fue de 7 días. Los animales se inyectaron con BrdU una única vez en el sexto día de infusión de la bomba y se sacrificaron 3 y 21 días después. (B) Análisis cuantitativo de la progresión del número de células BrdU⁺ en la SGZ de animales P8 tratados con salino o Noggin a los 3 y 21 días tras la inyección del análogo. Los animales P8 muestran un mayor número de células BrdU⁺ a los 21 días tras el tratamiento con Noggin (* $p < 0,05$). (C y D) Análisis cuantitativo del número de células BrdU⁺ que, a los 21 días tras la inyección del análogo, presentaron fenotipo de neurona madura (C) y astrocito maduro (D). Los animales P8, tras el tratamiento con Noggin, incrementan el porcentaje de formación de neuronas maduras y disminuyen el de astrocitos (* $p < 0,05$). Los datos se muestran como la media \pm E.E.M. $n \geq 4$.

mostraron un incremento en el número de células BrdU⁺ en comparación con los P8 tratados con salino (Figura R28 B, $p < 0,05$).

Para esclarecer la influencia de la vía de BMPs en el destino celular de las NSCs radiales, se realizó a 21 días un análisis por inmunohistoquímica de las poblaciones de neuronas granulares maduras (NeuN⁺) y astrocitos maduros (S100β⁺). Este estudio mostró cómo los animales tratados con Noggin incrementaron significativamente el porcentaje de neuronas maduras y disminuyeron el de astrocitos

maduros en comparación con los animales P8 tratados con salino (Figura R28 C y D respectivamente, $p < 0,05$ en ambos casos). Estos datos indican que el tratamiento con Noggin, en los animales P8 de 2 meses, recupera los niveles de neurogénesis y gliogénesis mostrados por los animales R1 de la misma edad en condiciones control (Figura R22 F y G).



*“¿Qué sabe el pez del agua
donde nada toda su vida?”*

Albert Einstein

discusión

DISCUSIÓN

El trabajo experimental de esta tesis doctoral se ha centrado en el estudio de las NSCs de la SVZ y SGZ en el modelo de envejecimiento prematuro y posible modelo de la EA, SAMP8, así como en su cepa control SAMR1. Principalmente se ha caracterizado el comportamiento y actividad de las NSCs en etapas anteriores a la aparición de los primeros síntomas de la EA. Cuando aparecen estos primeros síntomas de la enfermedad en pacientes (alteraciones cognitivas y pérdida de memoria), el daño neurológico ya es extenso y la esperanza de vida del paciente desde ese momento es de menos de 10 años. Dada la relación cada vez más estudiada entre algunas de las características patológicas de la EA y las alteraciones en la neurogénesis adulta, el conocimiento sobre la regulación de la actividad de las NSCs puede ser relevante para el desarrollo de posibles terapias que ayuden a combatir, por ejemplo, la pérdida de memoria asociada a la enfermedad.

1. Los animales P8 presentan, además de síntomas de envejecimiento prematuro, características similares a la EA a partir de los 6 meses de edad.

En términos generales, en este estudio se ha determinado los 6 meses como la edad en la que el envejecimiento aparentemente normal de la cepa P8 sufre un cambio significativo, se acelera y comienza a mostrar además características de un envejecimiento patológico, semejante al mostrado por los pacientes de la EA.

Se observó cómo los animales P8 a partir de los 6 meses de edad sufren alteraciones en algunos marcadores indirectos del envejecimiento como es el peso. Así, los animales P8 incrementan su peso de forma prácticamente paralela a su cepa control R1 hasta los 6 meses, edad a partir de la cual el peso de los animales P8 se mantiene constante, mientras que los animales R1 continúan su crecimiento normal (Takeda et al., 1997). Por otro lado, se observó un mayor número de fallecimientos en animales P8 a

partir de los 6 meses en comparación con los R1. Mientras que los animales R1 tienen una esperanza de vida muy superior a los 15 meses de edad, los animales P8 ven reducida su esperanza de vida a un 63% aproximadamente. Estos datos concuerdan con los publicados originalmente por Takeda en 1997 (Takeda et al., 1997), si bien la esperanza de vida de los animales empleados en nuestro estudio resultó superior a la descrita por Takeda, establecida en los 9,7 meses de edad. A pesar de que nuestros animales nos han permitido alcanzar edades mucho más avanzadas que en estudios anteriores, la edad a la que aparecen los síntomas más significativos de declive son los 6 meses, como se describe en otros trabajos.

Es a esa edad cuando los animales P8 empiezan a mostrar alteraciones relacionadas con la EA en una de las primeras regiones afectadas por la enfermedad, el hipocampo. Una de las alteraciones más definitorias de la EA en pacientes es la patología amiloide, caracterizada por un incremento del péptido A β 1-42 que finalmente agrega formando unos depósitos extracelulares denominados placas amiloides. Nuestros datos muestran un incremento significativo de los niveles de A β 1-42 en la región CA1 del hipocampo de los animales P8 de 6 meses respecto a los R1 de la misma edad. Estos datos concuerdan con lo publicado anteriormente por otros autores, que describen un aumento significativo de APP entre los 4 y 12 meses de los animales P8 que no se observa en los animales R1 (Morley et al., 2000), así como un incremento significativo del péptido A β 1-42 derivado de la proteólisis de APP en los animales P8 de 8 meses en comparación con los de 4 meses (Kumar et al., 2000). Algunos autores describen además una posible agregación del A β 1-42 en estructuras similares a las placas amiloides humanas en los P8 (Del Valle et al., 2010; Morley et al., 2000), aunque esta observación es controvertida (Manich et al., 2014). La proteína APP de ratón difiere en diversos aminoácidos de la APP humana, 3 de los cuales forman parte de la secuencia de A β 1-42 (His13, Arg5 y Tyr10). Esta diferencia parece explicar que dicho péptido tenga una menor capacidad de agregación en el ratón dado que, tanto la Arg5 como la His13, están implicadas en la agregación lateral de la protofibrillas que posteriormente forman las placas amiloides (Fung et al., 2004).

Como característica adicional de la EA, los animales P8 sufren un incremento secuencial de la gliosis, analizada en este estudio por la mayor presencia de la proteína GFAP en la CA1 del hipocampo. Este incremento se ha observado en otros modelos de la EA así como en pacientes de la enfermedad (Fernandez-Gomez et al., 2010; Sureda et al., 2006; Wu et al., 2005). Algunos autores sugieren que el aumento de la gliosis en el hipocampo de los P8 podría alterar el nicho neurogénico y crear un microambiente tóxico para las neuronas (Gang et al., 2011).

En este estudio no se ha analizado la tautopatía presentada por los animales P8, sin embargo, existen evidencias de una hiperfosforilación de Tau en esta cepa a los 5 meses de edad, así como de una activación de la proteína kinasa II (Cdk5) que fosforila Tau (Canudas et al., 2005).

Todas estas alteraciones, en combinación con alteraciones en el sistema neurogénico, podrían contribuir a los déficits de memoria y aprendizaje descritos en los animales P8, que también presentan los pacientes de la EA. Los animales P8 comienzan a mostrar disfunciones en la memoria y aprendizaje espacial, ambas dependientes de la función hipocampal, entorno a los 5-6 meses de edad. En cuanto al aprendizaje asociativo, los animales P8 muestran una capacidad de asociación menor que los R1 entre los 4 y los 8 meses de edad (revisado por Pallàs et al., 2008). Este dato, apunta nuevamente a los 6 meses como edad media de aparición de los síntomas característicos de la EA en los animales P8.

2. Caracterización de la actividad de las NSCs en la SVZ de los animales P8

2.1. Los animales P8 de 2 meses muestran un aumento en el número de células BrdU⁺ debido a la hiperproliferación transitoria de las NSCs

En este estudio, se ha analizado la actividad proliferativa en el nicho neurogénico de la SVZ de los animales P8 a lo largo de su vida. Para ello se han estudiado edades previas a la aparición de los primeros síntomas de la EA en estos animales (1 y 2 meses), la edad de aparición los primeros síntomas (6 meses) y edades posteriores, donde los animales muestran características destacables de la enfermedad (10 y 14 meses). A los 2 meses de edad, se observa un incremento transitorio en la actividad proliferativa de la SVZ de los animales P8 que se debe, al menos en parte, a un aumento en la proliferación de las NSCs (células tipo-B). A edades más tempranas, de 1 mes, ambas cepas muestran la misma actividad proliferativa, lo que descarta que la cepa P8 presente de forma inherente una mayor división celular. A edades más avanzadas, se observa una reducción drástica de dicha actividad, que decae por debajo de los niveles establecidos en los animales control R1 a los 14 meses de edad. Esta caída correlaciona con una disminución significativa de los niveles proliferativos de las NSCs de los animales P8. Sin embargo, aunque tanto los animales R1 como los P8 ven reducida su proliferación con el envejecimiento, los animales P8 muestran un descenso más drástico y anterior en el tiempo al mostrado por los animales R1, lo que podría apuntar a un agotamiento prematuro de las NSCs, tal vez resultante de su hiperproliferación previa.

Por otro lado, los experimentos *in vitro* realizados a distintas edades en los cuales se cultivan de forma selectiva las NSCs y progenitores (TAP) a modo de neuroesferas, muestran cómo los animales P8 jóvenes presentan un incremento en el número de neuroesferas, que además son más grandes que las de los R1. El elevado número de neuroesferas obtenidas en el cultivo primario correlaciona con un mayor número de NSCs *in vivo*. El incremento en el diámetro de estas neuroesferas indica una mayor capacidad proliferativa de las NSCs y/o de sus células hijas (TAP). Ambos datos apoyan la hipótesis de que el incremento en la proliferación observado en la SVZ de los animales P8 se puede deber, al menos en parte, al incremento en la proliferación de las NSCs.

Adicionalmente, el aumento proliferativo de las NSCs de la SVZ de los P8 a los 2 meses provoca un aumento en el número de células de nueva formación que llega al OB. Sorprendentemente, a esta edad, el tamaño promedio del OB de los P8 resulta significativamente menor que el de los R1. Estos datos sugieren que el incremento de la proliferación en la SVZ y la mayor llegada de neuroblastos al OB, no va acompañado de un incremento en la tasa de supervivencia ni de integración de las nuevas neuronas en la estructura del OB.

2.2. Análisis del comportamiento bifásico de las NSCs durante el envejecimiento de los animales P8

Tal y como se acaba de explicar, la actividad proliferativa en la SVZ de los animales P8 muestra un comportamiento bifásico a lo largo de la vida del individuo, presentando un incremento a edades tempranas, pre-sintomáticas, y una disminución por debajo de los niveles control a edades más avanzadas, post-sintomáticas. Este tipo de comportamiento bifásico podría conciliar los resultados aparentemente contradictorios observados en diversos modelos transgénicos de la EA, que describen tanto incrementos como disminuciones de la proliferación en los nichos neurogénicos adultos (revisado por Lopez-Toledano et al., 2010). Al igual que sucede en los animales P8, es probable que en otros modelos de la EA exista un incremento temprano en la actividad de las NSCs seguido por una reducción en la proliferación de dicha población, que coincida con la edad de aparición de los primeros síntomas de la EA. Es decir, es posible que la edad a la que se efectúe el análisis en cada modelo determine el tipo de alteración observado en la proliferación, y que esto explique los resultados opuestos que se describen en la literatura.

Este tipo de comportamiento con características bifásicas a lo largo de la vida del individuo se ha observado también en el hipocampo de una cepa de ratón aceptada como modelo de EA denominada J20 (López-Toledano y Shelanski, 2007). Esta cepa es portadora de las mutaciones Sueca e Indiana en la proteína humana APP y genera las primeras placas amiloides a una edad aproximada de 7 meses. En dicho estudio, se observó cómo los animales presentaban una mayor actividad proliferativa en estadios jóvenes (3 meses) que decaía hasta niveles inferiores a los mostrados por la cepa control a los 5 meses de edad. Además, se observó que el incremento proliferativo de los animales J20 jóvenes correlacionaba con un ligero aumento del A β 1-42 frente a su control.

De acuerdo con nuestros resultados *in vitro*, discutidos más abajo, el incremento proliferativo de las NSCs de la SVZ observado a los 2 meses en los animales P8, podría deberse a la presencia de pequeñas cantidades de A β 1-42 soluble, en estado monomérico o formando oligómeros de bajo peso molecular. Este A β 1-42 favorecería la proliferación de las NSCs de forma previa a la aparición de los primeros síntomas característicos de la EA.

La mayoría de estudios relacionados con la neurogénesis en modelos genéticos de la EA donde se sobreexpresa la proteína APP humana mutada defienden una disminución de la proliferación (Donovan et al., 2006; Haughey et al 2002). Es posible que en esos modelos la expresión constitutiva de APP bajo la regulación de promotores fuertes, u otros factores como los fondos genéticos variables de los animales transgénicos o sistemas de compensación por la activación de vías de señalización de efecto contrario, puedan hacer que un incremento proliferativo pre-sintomático como el descrito en P8 no tenga lugar o se produzca antes de la edad adulta del animal, siendo sólo observable el descenso proliferativo. Además, muchos de los trabajos mencionados donde se describe una reducción en la tasa de proliferación, llevan a cabo sus estudios en animales de edad avanzada que, en algunos casos, ya presentan síntomas de la EA como placas amiloides (Donovan et al., 2006; Haughey et al 2002). Estos datos concuerdan en parte con los nuestros, ya que a edades post-sintomáticas como las de los animales P8 envejecidos (14 meses) hemos observado una disminución en la proliferación y en el número de NSCs .

La reducción en el número de NSCs de los animales P8 con la edad puede deberse a varios factores. El primero podría ser el agotamiento de las NSCs debido a la hiperproliferación de las mismas durante los primeros estadios de la enfermedad (revisado por Lopez-Toledano et al., 2010). La hipótesis del agotamiento de las NSCs conllevaría necesariamente la existencia de una limitación en el número de veces que una NSC adulta es capaz de dividirse de forma natural o en condiciones patológicas. Aunque esta propuesta no ha sido plenamente aceptada actualmente, existen algunos estudios que apuntan a una capacidad limitada de división por parte de las NSCs tanto de la SVZ como del HC. En el caso de la SVZ, Kippin y colaboradores mostraron como en los animales carentes del inhibidor de ciclo celular p21cip1/waf1, la hiperproliferación de las NSCs entre los 2 y 8 meses, causa una disminución prematura de la actividad de las NSCs (Kippin et al., 2005). Por otro lado, las NSCs del hipocampo parecen llevar a cabo tres rondas de división rápidas tras las cuales se diferencian terminalmente a astrocitos, por lo que un aumento exacerbado de su proliferación conduciría a su depleción (Encinas et al., 2011).

Otro factor que explicaría la reducción drástica del número de NSCs en los P8 con la edad, podría ser el cambio en el estado de agregación del A β 1-42 y/o la alteración de su concentración entorno a las NSCs. Si la cantidad de A β 1-42 se incrementa con la edad, ésta, además de encontrarse en concentraciones superiores a las efectivas para aumentar la actividad proliferativa de las NSCs, incrementa la probabilidad de agregación del péptido por lo que su capacidad señalizadora podría verse afectada (Porayette et al., 2009; Heo et al., 2007). Así, además de perder su función señalizadora, adquiriría características tóxicas o citoestáticas para las células del nicho. Esta hipótesis también podría explicar por qué algunos modelos murinos transgénicos de la enfermedad, que expresan la proteína APP bajo la regulación de promotores fuertes, sólo muestran una disminución de la proliferación. Estos modelos,

producirían niveles de A β 1-42 muy elevados, superiores a la concentración efectiva que es capaz de aumentar la proliferación de las NSCs. Además, al tratarse del péptido humano, agregaría con mayor facilidad que el endógeno murino, causando posiblemente toxicidad.

Para esclarecer por completo el fenotipo bifásico de los animales P8 en la SVZ, se requerirían estudios que estableciesen si las NSCs se vuelven refractarias a la señal por A β 1-42 con la edad o si formas posteriores (más agregadas) del péptido, así como otros componentes de la patología como el estrés oxidativo, afectan negativamente la actividad de las NSCs en los animales viejos.

2.3. El péptido A β 1-42 induce la proliferación de las NSCs de la SVZ en cultivo

Como se ha mencionado anteriormente, el aumento en el número y diámetro de las neuroesferas obtenidas en el cultivo primario de los animales P8 de 2 meses correlaciona con un mayor número de NSCs *in vivo* y con un incremento en su actividad proliferativa. Nuestros resultados *in vitro* muestran además un incremento de la actividad esferogénica y proliferativa de las NSCs/progenitores derivados de los animales R1 en respuesta a la estimulación con A β 1-42 purificado de ratón. Por otro lado, el bloqueo de dicho péptido mediante la inmunodeplección con el anticuerpo 4G8 en cultivos de neuroesferas P8, tanto primarias como secundarias, reduce la capacidad autorrenovante y proliferativa del cultivo. El anticuerpo 4G8 reconoce específicamente los residuos 17 al 24 del A β 1-42 por lo que no se une a otros subproductos proteolíticos del procesamiento de APP como sAPP α o sAPP β . Ambos resultados refuerzan la posible implicación de A β 1-42 en el incremento proliferativo observado *in vivo* en las NSCs de los animales P8 jóvenes.

En concordancia con esta posibilidad, hemos observado mediante ELISA un ligero incremento en la cantidad de A β 1-42 presente en extractos de tejido de la SVZ de los animales P8 (1,1 ng/ml) con respecto a los R1 (0,7 ng/ml). Además, nuestros datos muestran un incremento en los niveles de expresión génica de *App* en los cultivos de NSCs de los animales P8 frente a sus controles R1. Adicionalmente, las neuroesferas de los animales P8 mantienen aumentada su proliferación a lo largo de los pases y su medio condicionado posee la capacidad de inducir la proliferación de los cultivos R1. Estos datos en conjunto, no sólo apoyan la posible implicación del A β 1-42 en el incremento proliferativo *in vivo*, sino que además, sugieren un efecto autocrino del péptido sobre las NSCs de los animales P8.

Las concentraciones de A β 1-42 empleadas en este estudio corresponden a un rango de entre 0,4 y 5 nM, que es al menos 250 veces menor que la menor concentración utilizada en estudios previos, en los que también se ha analizado el efecto de A β 1-42 sobre los cultivos de NSCs. Asimismo, el estado de agregación del péptido en este estudio es mayoritariamente monomérico a diferencia del empleado en los estudios previos. En este sentido, cabe destacar que las concentraciones de A β 1-42 soluble

presentes en extractos de tejido cerebral fresco de pacientes de la EA se encuentra entre los 300 – 3750 ng/ml (McDonald et al., 2010). Este dato sugiere que la concentración de A β 1-42 soluble en estadios avanzados de la EA es entre 3 y 100 veces mayor que la mayor concentración de A β 1-42 analizada por nosotros. Así, las cantidades de A β 1-42 soluble analizadas en esta tesis, podrían reflejar la cantidad de A β 1-42 soluble presente en el cerebro humano en estadios muy tempranos de la EA.

Hemos visto que una concentración de entre 2 y 25 ng/ml de A β 1-42 en estado principalmente monomérico es capaz de incrementar tanto la capacidad esferogénica como proliferativa de las NSCs de animales R1 en cultivo. Nuestros datos parecen apuntar además a que las concentraciones de A β 1-42 necesarias para inducir el incremento proliferativo son mayores que las necesarias para inducir el efecto esferogénico. Este hecho podría explicar por qué el medio condicionado de las neuroesferas P8 es capaz de inducir la autorrenovación pero no la proliferación del cultivo R1.

En relación a los estudios previos del efecto de A β 1-42 sobre las NSCs, Lopez-Toledano y Shelanski muestran un efecto neurogénico en las NSCs hipocampales cuando añaden 1mM del péptido en estado preferentemente oligomérico (Lopez-Toledano and Shelanski, 2004). Otros autores como Calafiore y colaboradores, apoyan este mismo efecto neurogénico mediante la adición de 25 μ M del péptido en estado fibrilar a los cultivos de NSCs (Calafiore et al., 2006). Además otros estudios muestran un incremento proliferativo de las NSCs procedentes de la SVZ de animales jóvenes mediante la adición de 1-5 μ M en estado oligomérico (Heo et al., 2007) y 5 μ M en estado oligomérico o fibrilar (Sotthibundhu et al., 2009). Bajo nuestra experiencia, el estado plenamente oligomérico o fibrilar del A β 1-42, especialmente humano, es difícil de obtener dado que siempre existe una fracción minoritaria de péptido en estado monomérico. Así, los estudios antes citados podrían estar en consonancia con nuestros resultados, pues a pesar de que emplean concentraciones elevadas de péptido principalmente oligomérico, es posible que sus preparaciones contengan también péptido monomérico.

Por otro lado, existen algunos estudios que observan efectos negativos en proliferación y neurogénesis sobre progenitores neurales humanos y murinos al tratarlos con 100 nM del péptido A β 1-42 (Haughey et al., 2002). Esta posible discrepancia con nuestras observaciones puede deberse a que este estudio se llevó a cabo en parte con animales transgénicos de 12-14 meses de edad que sobreexpresan APP humano mutado. A esta edad, los propios autores ya observan la presencia de placas amiloides que pueden tener efectos neurotóxicos. Además, los estudios *in vitro* se realizan en presencia de suero lo que puede alterar la señalización del péptido que, de forma adicional, se añade a los cultivos ya en conformación fibrilar.

En nuestros resultados, se observa que el efecto tanto esferogénico como proliferativo de A β 1-42 está mediado a través de la vía de señalización PI3K/Akt. Esta vía de señalización ha sido descrita por varios autores como la vía implicada en el efecto de A β 1-42, ya sea éste neuroprotector o neurotóxico, según

su concentración y especialmente su estado de agregación (Jimenez et al., 2011). Además, las alteraciones en la regulación de Akt y su fosforilación han sido descritas como puntos clave en la patología de la EA (Griffin et al., 2005).

La vía PI3K/Akt parece cumplir funciones esenciales en la regulación de la autorrenovación de las NSCs tanto *in vivo* como *in vitro* (Le Belle et al., 2011). Le Belle y colaboradores apuntan a que la presencia de cantidades no tóxicas de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS, del inglés Reactive Oxygen Species) tanto añadidas exógenamente como producidas de forma endógena por las NSCs, incrementaría su capacidad esferogénica a través de la vía PI3K/Akt. Asimismo, su inhibición *in vivo* provocaría una disminución del número de NSCs en proliferación en la SVZ. Dada la relación entre el péptido A β 1-42 y el aumento de ROS (Hensley et al., 1994), cabe pensar que dicho péptido incrementa las ROS haciendo que señalicen vía PI3K/Akt y potencien la capacidad esferogénica de las NSCs.

3. Caracterización de la actividad de las NSCs en la SGZ de los animales P8

3.1. Las poblaciones SOX2⁺ radiales y no radiales de los P8 se pierden a edades tempranas y las neuronas de nueva formación no maduran

Del mismo modo que en la SVZ, se ha analizado la actividad proliferativa en el nicho neurogénico de la SGZ de los animales P8 a distintas edades. Así, se analizaron edades tanto anteriores como posteriores a la edad de aparición de los primeros síntomas característicos de la EA (6 meses). En este caso, los animales P8 presentan los mismos niveles proliferativos que los R1 a edades tempranas de 1 y 2 meses de edad. Sin embargo, de forma similar a lo observado en la SVZ, pero de aparición aún más precoz, los animales P8 muestran una menor actividad proliferativa que los R1 ya a los 6 meses de edad. Nuestros datos no muestran un pico proliferativo en la SGZ de los animales P8 a edades pre-sintomáticas. No obstante, no se puede descartar que dicho pico pueda encontrarse desplazado en el tiempo con respecto a la SVZ y situarse, por ejemplo, entre el mes y los 2 meses de edad. Por otro lado, las NSCs radiales sí parecen tener mayor actividad proliferativa en los animales P8 de 2 meses, como sucede en la SVZ, pero su pérdida a edades tempranas podría enmascarar el posible pico en los niveles de proliferación general.

El estudio detallado de las diferentes poblaciones que conforman la progresión neurogénica muestra una disminución significativa en el número de NSCs radiales y células SOX2⁺ no radiales en los animales P8 a los 2 meses en comparación con los R1 de la misma edad. Nuestros datos indican que esta disminución no se debe a una entrada en senescencia por parte de las células SOX2⁺ de los P8. Por contra, cabe la posibilidad de que éstas entren en apoptosis, ya que existe un mayor número de células positivas para la forma activa de Caspasa3 en los animales P8, cuyos marcadores y morfología son difíciles de caracterizar. Sin embargo, los números de células en apoptosis muestran valores muy bajos y

los estudios de pulso-caza a tiempos cortos (2 horas, 1 y 3 días) no muestran alteraciones ni en el número, ni en la progresión de las células precursoras con respecto a los animales R1. Ambos datos no parecen apoyar pues la posibilidad de que las NSCs se pierdan por senescencia o muerte masiva de las mismas.

A nivel proliferativo, tanto el número de NSCs radiales como SOX2⁺ no radiales en proliferación, es el mismo en los animales R1 y P8 de 2 meses. Sin embargo, los animales P8 presentan un mayor porcentaje de células en ciclo (Ki67⁺) en ambas poblaciones. Por ello, tanto las NSCs radiales como las SOX2⁺ no radiales de los P8 son poblaciones más activas que las de los R1. En el caso de las NSCs radiales, cuando se cuantifican las células en fase S (BrdU⁺), no se observa un mayor porcentaje de células BrdU⁺. Este dato podría apuntar a un posible desajuste del ciclo celular, que podría deberse a diversos motivos. Una posibilidad es que algunas de estas células estén paradas en algún punto del ciclo celular, lo que permitiría la expresión de Ki67 pero no llegarían a la fase S; es decir, a pesar de presentar un mayor porcentaje de células en ciclo (Ki67⁺), no aumentaría de forma significativa el porcentaje de células BrdU⁺. Otra opción podría ser la elongación de su ciclo celular por motivos patológicos o por el tipo de división que sufren en su diferenciación hacia astrocito. Estas hipótesis requerirían de un estudio específico para su esclarecimiento.

El estudio de las poblaciones de neuroblastos y neuronas inmaduras mostró un mayor número de células DCX⁺ en los animales P8. Esta observación contrasta con el hecho de que la producción de neuronas es la misma en R1 y P8 (puesto que el número de células DCX⁺ BrdU⁺ a 2h y 1d en los experimentos de pulso-caza es equivalente en las dos cepas) y con el hecho de que a los 3 días tras la inyección de BrdU, el número de dichas células DCX⁺ BrdU⁺ es incluso menor en los animales P8 comparados con los R1. Una posible explicación para la acumulación de las células DCX⁺ es el hecho de que estas neuronas inmaduras no parecen madurar normalmente, ya que existe un número significativamente menor de células DCX⁺ CALRETININA⁺ en los animales P8 frente a su control. Estos datos concuerdan en parte con los obtenidos por Gang y colaboradores a edades más tardías de los animales P8. Estos autores observan un incremento en el número de neuronas inmaduras DCX⁺, pero un menor número de neuronas maduras NeuN⁺, tanto totales como analizadas un mes después de la inyección con BrdU, en los animales P8 en comparación con los R1 (Gang et al., 2011). Además, observan un descenso drástico de la supervivencia en la población DCX⁺ en los animales P8. Todos estos datos, podrían apuntar a una acumulación de nuevas neuronas incapaces de progresar en su maduración o con un ritmo de maduración menor al de sus controles. Por otro lado, si estas células DCX⁺ no maduran y no se integran acaban muriendo, lo que podría explicar en parte el mayor número de células Caspasa3⁺ en la SGZ de los P8 de 2 meses.

3.2. Las NSCs radiales de los P8 jóvenes se diferencian a astrocitos maduros

Los experimentos de pulso-caza a tiempos largos (21 días) en los animales P8 de 2 meses demostraron que las NSCs generan un menor número de neuronas maduras (NeuN^+) y un mayor número de astrocitos maduros ($\text{S100}\beta^+$) con respecto a su control R1. Según estudios previos, la gliogénesis ocurre de forma habitual en la SGZ como parte de un proceso fisiológico (Encinas et al., 2011; Steiner et al., 2004). Se ha descrito que las NSCs radiales realizan 3 ciclos de división sucesivos para finalmente, y tras su última división, diferenciarse terminalmente a astrocitos maduros ($\text{S100}\beta^+$). Si esta diferenciación terminal no se compensa con divisiones de tipo simétrico de las NSCs, el proceso necesariamente conllevará la depleción de la población de células madre. Según Encinas y colaboradores, la diferenciación astrogial de las NSCs puede estar detrás del descenso de la neurogénesis hipocampal asociado a la edad.

En los animales P8, las alteraciones en los niveles de señales gliogénicas como las BMPs a edades tempranas podrían acelerar este proceso, produciendo una gran depleción de las NSCs radiales. Nuestros datos apuntan a una depleción, no sólo de las NSCs radiales, sino también de las células SOX2^+ no radiales que derivan de ellas. Este hecho concuerda con lo estudiado por otros autores que observan cómo los nuevos astrocitos se generan directamente de la diferenciación de las NSCs radiales (Steiner et al., 2004; Encinas et al., 2011). Por otro lado, el menor número de neuronas maduras (NeuN^+) generadas por los animales P8 podría deberse a la menor tasa de proliferación de las DCX^+ y a su incapacidad de avanzar en su estado de maduración. Así, todas aquellas células DCX^+ que en su última ronda de división adquiriesen el marcaje BrdU^+ , después de 21 días, podrían haber muerto ante su incapacidad de madurar, disminuyendo el número total de neuronas maduras generadas. En conjunto, todo este proceso podría inducir, a edades más tardías, disfunciones neurogénicas importantes en la SGZ, que podrían contribuir a las alteraciones comportamentales de los animales P8 similares a las de la EA (Li et al., 2013).

3.3. BMP6 se sobreexpresa en los animales P8 jóvenes y presenta propiedades gliogénicas

Nuestro estudio muestra un incremento significativo en la expresión génica de *Bmp6* en los animales P8 de 2 meses. A pesar de que la expresión proteica de la forma inmadura de BMP6 es la misma en ambas cepas, la forma madura de BMP6 en los animales P8 es claramente más abundante. La elevada presencia de BMP6 madura en los animales P8 puede explicar que la vía de señalización de BMPs esté más activa y que el giro dentado presente mayores niveles de SMAD 1/5/8 fosforilado. Además, BMP6 *in vitro* mostró una elevada capacidad gliogénica sobre células madre hipocampales de rata (HC7). Estos datos, junto con los estudios *in vivo* de bloqueo de la vía de BMPs mediante la infusión de Noggin,

apuntan a que las NSCs de los animales P8 adoptan la vía gliogénica de diferenciación en presencia de elevadas concentraciones de BMP6 en el nicho de la SGZ.

Las posibles diferencias observadas entre la actividad proliferativa de la SVZ y de la SGZ, podrían tener su origen en las diferencias observadas a nivel de moléculas señalizadoras en ambos nichos (BMP6 y A β 1-42). En relación al A β 1-42, el análisis de concentración por ELISA muestra cómo los animales P8 de 2 meses presentan en la SVZ cantidades significativamente mayores del péptido en comparación con su DG. Así, la cantidad de A β 1-42 detectada en el DG de los animales P8 de 2 meses equivale a la presentada por los animales R1 en la SVZ. Por el contrario, los animales P8 no muestran un incremento en la expresión génica de *Bmp6* en la SVZ. Además, el antagonista de la vía de BMPs, *Noggin*, está más expresado en la SVZ de los animales P8 frente a sus controles R1. Adicionalmente, diversos estudios afirman que las células endoteliales generan grandes cantidades de *Noggin* (revisado en Ihrie y Alvarez-Buylla., 2011), lo que en última instancia podría contribuir a reducir la señalización por BMPs en la SVZ, pero no en la SGZ. Es decir, el balance entre las señales proliferativas (A β 1-42) y gliogénicas (BMP6) en los dos nichos es diferente, lo que puede influir en que el comportamiento de las NSCs de estas dos regiones sea también diferente.

El hecho de que BMP6 induzca la diferenciación a astrocitos de las NSCs del DG, haciendo posiblemente que esta población se reduzca drásticamente *in vivo*, podría apuntar a dicha señalización como un proceso patológico temprano en los P8. Este proceso podría estar relacionado con la EA, puesto que BMP6 está elevado tanto en el hipocampo de los pacientes de EA como en el modelo genético de la enfermedad mThy1-hAPP751 (Crews et al., 2010). De hecho, BMP6 se localiza alrededor las placas amiloides tanto difusas como maduras. Por otro lado, durante el envejecimiento se ha descrito un incremento en la activación de la vía de BMPs en el hipocampo posiblemente debido a la mayor presencia de BMP6, entre otras BMPs. Este incremento se asocia a la disminución neurogénica observada con la edad (Yousef et al., 2014). Sin embargo, también existen evidencias de que BMP6 puede ejercer un efecto protector frente a los posibles daños o alteraciones provocadas por el A β . Así, BMP6, en combinación con pequeñas cantidades del péptido, protege frente a patologías asociadas a la EA, como la formación de los cuerpos de Hirano o agregados citoplásmicos de actina con morfología fibrilar (Sun et al., 2014). Además, se ha observado su capacidad de inducir reparación neuronal después de procesos de isquemia (Wang et al., 2001) o daños inducidos por elevadas concentraciones de ROS (Du et al., 2007).

Por todo lo anterior, es posible que en la SGZ de los animales P8, el incremento de BMP6 se induzca como sistema de compensación a señales de daño neuronal. Este incremento produciría la diferenciación de las NSCs a astrocitos, causando la pérdida de esta población celular. Algunos estudios como los desarrollados por Gratacòs y colaboradores, sugieren que la capacidad neurotrófica de la

BMP6 sobre las neuronas maduras (Calbindina⁺) depende de la presencia de los astrocitos generados por la inducción de BMP6 (Gratacòs et al., 2002). Si el incremento de BMP6 se produce de forma patológica o como respuesta compensatoria a señales de daño temprano en los animales P8 sigue siendo un punto de estudio aún por caracterizar.

3.4. La infusión *in vivo* de Noggin rescata el número de NSCs radiales de los animales P8 y reduce el número de neuroblastos y neuronas inmaduras

La inhibición *in vivo* de la vía de las BMPs, mediante la infusión de Noggin, mostró un incremento significativo en el número total de NSCs radiales en los animales P8 que no se da en sus controles R1. Además, las NSCs radiales de los P8 presentan un incremento significativo en su proliferación en respuesta a Noggin que también muestran los animales R1. En el caso de las SOX2⁺ no radiales, parece haber un sutil incremento en número en los P8 tratados con Noggin. No obstante, esta población de células SOX2⁺ no radiales no presenta diferencias significativas a nivel proliferativo ni entre cepas ni entre tratamientos. Los datos de los animales R1 tratados con Noggin concuerdan con los observados en una publicación previa del grupo empleando ratones Crl:CD1 (Mira et al., 2010). Así, es importante destacar que el incremento significativo en el número de NSCs radiales y el ligero incremento en el número de progenitores no radiales observado en los animales P8 tratados con Noggin, es en cambio específico de esta cepa, pues no se observa ni en animales R1 ni en Crl:CD1. Este hecho plantea la posibilidad de que el bloqueo de la actividad anormalmente elevada de BMP6 en los P8 frene el proceso de diferenciación terminal de las NSCs radiales hacia astrocito, evitando así que disminuya la población de NSCs radiales. De este modo, hay un rescate en el número de NSCs radiales que, además proliferan más, lo que podría estar produciendo ese aumento sutil del número de SOX2⁺ no radiales.

En cuanto a las poblaciones inmaduras de neuronas (DCX⁺), los animales R1 incrementan el número de estas células cuando se los trata con Noggin, al igual que sucede en animales Crl:CD1, según lo descrito por Mira et al., 2010. Sin embargo, el número de células DCX⁺ en los animales P8 no se incrementa, sino que disminuye en presencia de Noggin para igualar el número de células DCX⁺ mostrado por los R1 también tratados con Noggin. Este dato, por un lado concuerda con el hecho de que Noggin no altera el número de células DCX⁺ BrdU⁺ de los P8 a los 3 días de la inyección con BrdU. Por otro lado concuerda con que el número de neuroblastos y neuronas inmaduras presentes en los tercios exteriores de la GCL de los P8, disminuyó significativamente tras el tratamiento con Noggin, lo que en última instancia contribuiría a reducir el número total de células DCX⁺. Estas células DCX⁺ que dejan de observarse en los tercios exteriores de la GCL podrían estar muriendo y/o madurando de forma más efectiva a neurona madura. No obstante, el hecho de que el número de células Capasa3⁺ tras el tratamiento con Noggin en los P8 se reduzca drásticamente, sugiere que no existe mayor muerte, sino al contrario. Estos datos

junto con el incremento de células NeuN⁺ a los 21 días del tratamiento con Noggin, que se discute en el siguiente apartado, podría apuntar a un aumento de la supervivencia y maduración de las neuronas inmaduras tras el bloqueo de la señalización de BMP6.

3.5. La infusión *in vivo* de Noggin reduce el número de nuevos astrocitos e incrementa el número de nuevas neuronas maduras

Los resultados del análisis a 21 días tras la infusión de Noggin muestran, por un lado, un incremento significativo en el número de BrdU⁺ en los animales tratados con el antagonista frente a los tratados con salino. Este aumento apoya los resultados obtenidos por otros autores donde, tanto *in vitro* como *in vivo*, se observa un incremento en el número de células BrdU⁺ tras el tratamiento con Noggin (Bonaguidi et al., 2008; Mira et al., 2010). Además, se observa una disminución significativa en la proporción de células cuyo destino es el de astrocito maduro en comparación con los animales P8 tratados con salino, así como existe un incremento en el número de células diferenciadas a neurona madura. Estos datos apoyan por un lado el posible efecto gliogénico de BMP6 *in vivo*, que se vería bloqueado en presencia de Noggin. Este bloqueo hace que las NSCs adquieran en menor medida un destino astrogial, imitando así la situación fisiológica de los animales R1 de la misma edad. Por otro lado, y como se apuntaba anteriormente, estos datos parecen apoyar el incremento de la supervivencia de las células DCX⁺, en presencia de Noggin, haciendo que un mayor número de ellas lleguen a su madurez (NeuN⁺).

El tratamiento con Noggin induce la proliferación de las NSCs lo que en última instancia, podría provocar el agotamiento de las NSCs por hiperproliferación, generando una disminución en la neurogénesis aproximadamente al mes del tratamiento con el antagonista (Mira et al., 2010). En este caso, se requiere de un mayor estudio para esclarecer si la hiperproliferación de las NSCs de los animales P8 tratados con Noggin, puede inducir su agotamiento. Por otro lado, es importante conocer si la supervivencia y posible mejora en la maduración de las neuronas inmaduras se observa únicamente de forma puntual tras el tratamiento con Noggin o si por el contrario se mantiene en el tiempo. Si el efecto de Noggin sobre esta población perdurase en el tiempo, sería interesante estudiar la posible mejora en los déficits de memoria y aprendizaje dependientes de hipocampo mostrados por los animales P8 a edades más avanzadas. Estos datos, sumados a los del presente estudio, podrían plantear la regulación de los niveles de BMP6 como método preventivo que retardase la aparición de los primeros síntomas de la EA.

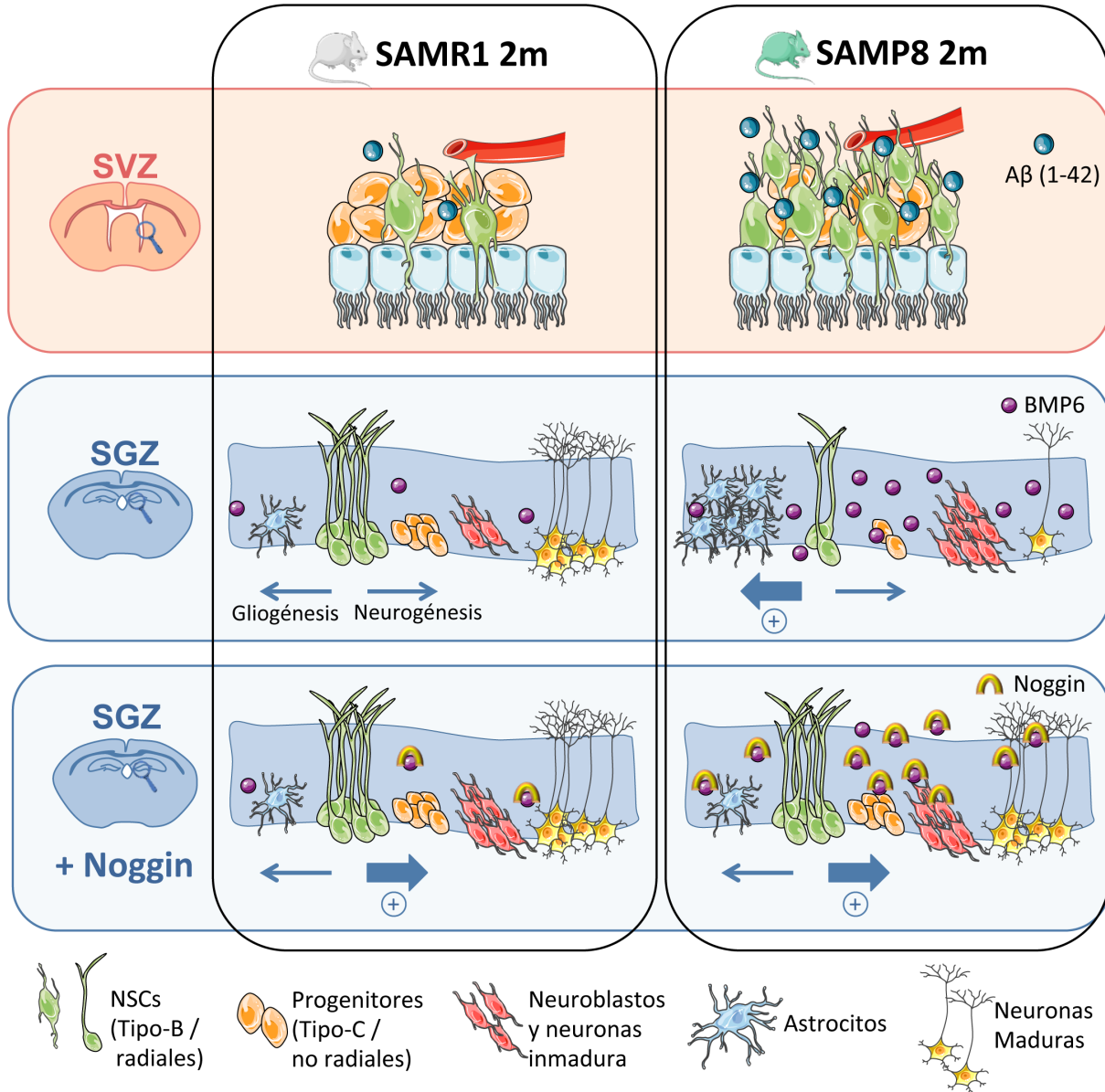
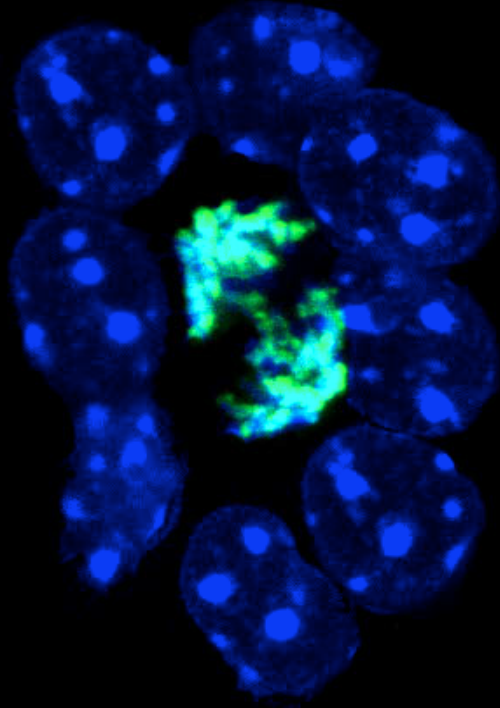


Figura D1. Modelo *in vivo* de la actividad de las NSCs adultas de la SVZ y de la SGZ en SAMP8 y su control SAMR1 a los 2 meses de edad. En la SVZ, los animales P8 muestran un elevado número de NSCs. Estas NSCs podrían generar pequeñas concentraciones de $A\beta$ (1-42) posiblemente en estado monomérico. El $A\beta$ (1-42) a través de la vía de señalización PI3K/Akt incrementaría la tasa de autorrenovación y proliferación de las NSCs provocando un aumento de neurogénesis en el OB. En la SGZ, los animales P8 presentan una población de NSCs radiales y no radiales muy reducida. Además presentan un elevado número de neuronas inmaduras incapaces de progresar en su maduración, lo que se traduce en un menor número de neuronas maduras. Por otro lado las NSCs generan más astrocitos, lo que puede deplecionar la población de NSCs. Estas circunstancias se dan en presencia de elevadas cantidades de BMP6 madura y por tanto una mayor activación de la vía de BMPs. Si se bloquea esta vía mediante la infusión de Noggin, los animales P8 presentan un mayor número de NSCs radiales y no radiales así como un menor número de astrocitos procedentes de las NSCs. Además, reducen el número de neuronas inmaduras e incrementan la presencia de neuronas maduras.



*“He averiguado que vivimos en un
insignificante planeta de una triste estrella
perdida en una galaxia metida en una
esquina olvidada de un universo en el que hay
muchas más galaxias que personas”*

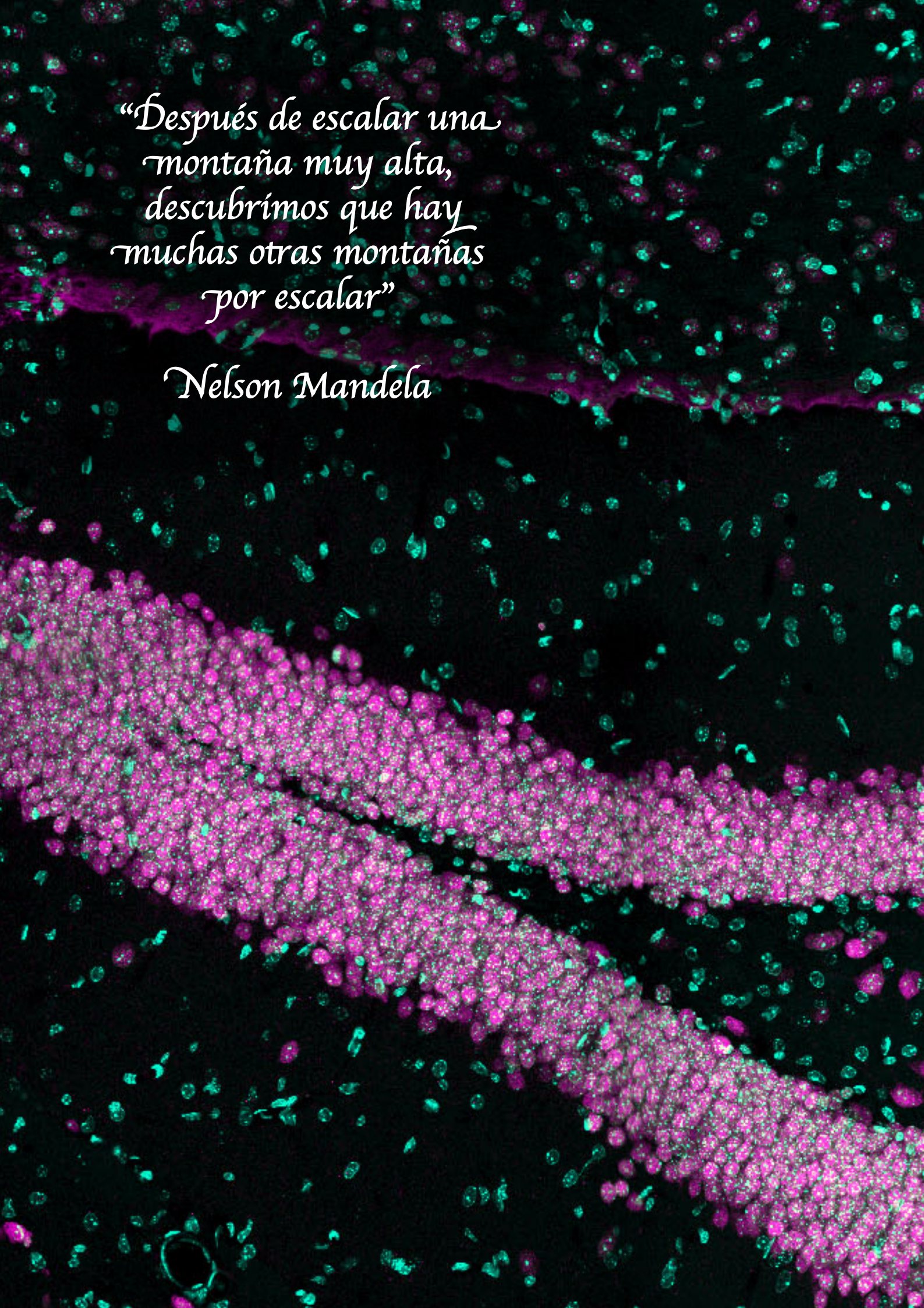
Carl Sagan

conclusiones

CONCLUSIONES

- 1.** Los animales SAMP8 empiezan a mostrar alteraciones relacionadas con el envejecimiento prematuro característico de la cepa entorno a los 6 meses de edad. A esta misma edad, los animales SAMP8 también empiezan a mostrar patologías características de la EA.
- 2.** La proliferación en la SVZ de los animales SAMP8 aumenta de forma transitoria a los 2 meses de edad, incrementando la formación de nuevas neuronas en el OB, pero decae a los 14 meses. Este incremento proliferativo a los 2 meses se debe, al menos en parte, a un aumento de la actividad de las NSCs de la SVZ.
- 3.** Los cultivos de neuroesferas de la SVZ de animales SAMP8 de 2 meses muestran una mayor proliferación y capacidad esferogénica que los de los animales SAMR1 de la misma edad. La sobreexpresión de APP y/o la secreción de A β 1-42 por las neuroesferas de los animales SAMP8 jóvenes podría explicar dicho efecto.
- 4.** El péptido A β 1-42 murino, a concentraciones entorno a 2 ng/ml y en estado principalmente monomérico, induce la proliferación y capacidad esferogénica de las neuroesferas control SAMR1 a través de la vía de señalización PI3K/Akt.
- 5.** En la SGZ, los animales SAMP8 de 2 meses presentan un menor número de NSCs radiales y células SOX2⁺ no radiales que los SAMR1, pero ambas poblaciones son proliferativamente más activas que en la cepa control. Sin embargo, los animales SAMP8 presentan un mayor número de neuroblastos y neuronas inmaduras, a pesar de que su capacidad de producir dichas células es reducida.

- 6.** Las NSCs de la SGZ de los animales SAMP8 de 2 meses generan un mayor número de astrocitos y un menor número de neuronas maduras en comparación con los animales SAMR1.
- 7.** El DG de los animales SAMP8 de 2 meses presenta niveles elevados de BMP6 madura así como un incremento de SMAD fosforilada. BMP6 muestra efectos claramente gliogénicos sobre células madre hipocampales adultas en cultivo.
- 8.** La inhibición de la vía de BMPs mediante la infusión intraventricular de Noggin incrementa el número de NSCs radiales en la SGZ así como su proliferación, en animales SAMP8 de 2 meses. Además, normaliza el número de neuroblastos y neuronas inmaduras mostradas por los animales SAMP8, igualándolos a los SAMR1.
- 9.** Tras la inhibición de la vía de BMPs mediante la administración de Noggin, las NSCs de la SGZ de los animales SAMP8 generan un menor número de astrocitos y un mayor número de neuronas maduras en comparación con los animales SAMP8 tratados con suero salino.



*“Después de escalar una
montaña muy alta,
descubrimos que hay
muchas otras montañas
por escalar”*

Nelson Mandela



bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

Aberg MA, Aberg ND, Palmer TD, Alborn AM, Carlsson-Skewir C, Bang P, Rosengren LE, Olsson T, Gage FH, Eriksson PS (2003) IGF-I has a direct proliferative effect in adult hippocampal progenitor cells. *Mol Cell Neurosci* 24:23-40.

Ables JL, Decarolis NA, Johnson MA, Rivera PD, Gao Z, Cooper DC, Radtke F, Hsieh J, Eisch AJ (2010) Notch1 is required for maintenance of the reservoir of adult hippocampal stem cells. *J Neurosci* 30:10484-10492.

Aimone JB, Li Y, Lee SW, Clemenson GD, Deng W, Gage FH (2014) Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. *Physiol Rev* 94:991-1026.

Allen E (1912) The cessation of mitosis in the central nervous system of the albino rat. *J Comp Neurol* 22:547-568.

Altman J (1962) Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 135:1127-1128.

Altman J (1969) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol* 137:433-457.

Altman J, Das GD (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124:319-335.

Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM (2002) Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 22:629-634.

Arruda-Carvalho M, Sakaguchi M, Akers KG, Josselyn SA, Frankland PW (2011) Posttraining ablation of adult-generated neurons degrades previously acquired memories. *J Neurosci* 31:15113-15127.

Babu H, Claasen JH, Kannan S, Runker AE, Palmer T, Kempermann G (2011) A protocol for isolation and enriched monolayer cultivation of neural precursor cells from mouse dentate gyrus. *Front Neurosci* 5:89.

Balordi F, Fishell G (2007) Hedgehog signaling in the subventricular zone is required for both the maintenance of stem cells and the migration of newborn neurons. *J Neurosci* 27:5936-5947.

Bannerman DM, Deacon RM, Offen S, Friswell J, Grubb M, Rawlins JN (2002) Double dissociation of function within the hippocampus: spatial memory and hyponeophagia. *Behav Neurosci* 116:884-901.

Berezovska O, Xia MQ, Hyman BT (1998) Notch is expressed in adult brain, is coexpressed with presenilin-1, and is altered in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:738-745.

Bermejo-Pareja F, Benito-Leon J, Vega S, Medrano MJ, Roman GC (2008) Incidence and subtypes of dementia in three elderly populations of central Spain. *J Neurol Sci* 264:63-72.

Bird TD (2008) Genetic aspects of Alzheimer disease. *Genet Med* 10:231-239.

Boekhoorn K, Joels M, Lucassen PJ (2006) Increased proliferation reflects glial and vascular-associated changes, but not neurogenesis in the presenile Alzheimer hippocampus. *Neurobiol Dis* 24:1-14.

Bonaguidi MA, McGuire T, Hu M, Kan L, Samanta J, Kessler JA (2005) LIF and BMP signaling generate separate and discrete types of GFAP-expressing cells. *Development* 132:5503-5514.

Bonaguidi MA, Peng CY, McGuire T, Falciglia G, Gobeske KT, Czeisler C, Kessler JA (2008) Noggin expands neural stem cells in the adult hippocampus. *J Neurosci* 28:9194-9204.

Bonaguidi MA, Wheeler MA, Shapiro JS, Stadel RP, Sun GJ, Ming GL, Song H (2011) In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics. *Cell* 145:1142-1155.

Bonfanti L, Peretto P (2011) Adult neurogenesis in mammals--a theme with many variations. *Eur J Neurosci* 34:930-950.

Breton-Provencher V, Lemasson M, Peralta MR, III, Saghatelian A (2009) Interneurons produced in adulthood are required for the normal functioning of the olfactory bulb network and for the execution of selected olfactory behaviors. *J Neurosci* 29:15245-15257.

Brown J, Cooper-Kuhn CM, Kempermann G, van PH, Winkler J, Gage FH, Kuhn HG (2003a) Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *Eur J Neurosci* 17:2042-2046.

Brown JP, Couillard-Despres S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG (2003b) Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol* 467:1-10.

Caille I, Allinquant B, Dupont E, Bouillot C, Langer A, Muller U, Prochiantz A (2004) Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. *Development* 131:2173-2181.

Calafiore M, Battaglia G, Zappala A, Trovato-Salinaro E, Caraci F, Caruso M, Vancheri C, Sortino MA, Nicoletti F, Copani A (2006) Progenitor cells from the adult mouse brain acquire a neuronal phenotype in response to beta-amyloid. *Neurobiol Aging* 27:606-613.

Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E (1993) Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 56:337-344.

Campion D, Dumanchin C, Hannequin D, Dubois B, Belliard S, Puel M, Thomas-Anterion C, Michon A, Martin C, Charbonnier F, Raux G, Camuzat A, Penet C, Mesnage V, Martinez M, Clerget-Darpoux F, Brice A, Frebourg T (1999) Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am J Hum Genet* 65:664-670.

Canudas AM, Gutierrez-Cuesta J, Rodriguez MI, Acuna-Castroviejo D, Sureda FX, Camins A, Pallas M (2005) Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau in senescence-accelerated mouse (SAM). *Mech Ageing Dev* 126:1300-1304.

Capela A, Temple S (2002) LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal. *Neuron* 35:865-875.

Chiasson BJ, Tropepe V, Morshead CM, van der Kooy D (1999) Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. *J Neurosci* 19:4462-4471.

Clark CM, Davatzikos C, Borthakur A, Newberg A, Leight S, Lee VM, Trojanowski JQ (2008) Biomarkers for early detection of Alzheimer pathology. *Neurosignals* 16:11-18.

Colak D, Mori T, Brill MS, Pfeifer A, Falk S, Deng C, Monteiro R, Mummery C, Sommer L, Gotz M (2008) Adult neurogenesis requires Smad4-mediated bone morphogenic protein signaling in stem cells. *J Neurosci* 28:434-446.

Colucci-D'Amato L, Bonavita V, di PU (2006) The end of the central dogma of neurobiology: stem cells and neurogenesis in adult CNS. *Neurol Sci* 27:266-270.

Coskun V, Venkatraman G, Yang H, Rao MS, Luskin MB (2001) Retroviral manipulation of the expression of bone morphogenetic protein receptor Ia by SVZa progenitor cells leads to changes in their p19(INK4d) expression but not in their neuronal commitment. *Int J Dev Neurosci* 19:219-227.

Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, Bogdahn U, Winkler J, Kuhn HG, Aigner L (2005) Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur J Neurosci* 21:1-14.

Crews L, Adame A, Patrick C, Delaney A, Pham E, Rockenstein E, Hansen L, Masliah E (2010) Increased BMP6 levels in the brains of Alzheimer's disease patients and APP transgenic mice are accompanied by impaired neurogenesis. *J Neurosci* 30:12252-12262.

Cui Y, Jean F, Thomas G, Christian JL (1998) BMP-4 is proteolytically activated by furin and/or PC6 during vertebrate embryonic development. *EMBO J* 17:4735-4743.

Cummings BJ, Su JH, Cotman CW (1993) Neuritic involvement within bFGF immunopositive plaques of Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 124:315-325.

Deisseroth K, Singla S, Toda H, Monje M, Palmer TD, Malenka RC (2004) Excitation-neurogenesis coupling in adult neural stem/progenitor cells. *Neuron* 42:535-552.

Del Valle J, Duran-Vilaregut J, Manich G, Casadesus G, Smith MA, Camins A, Pallas M, Pelegri C, Vilaplana J (2010) Early amyloid accumulation in the hippocampus of SAMP8 mice. *J Alzheimers Dis* 19:1303-1315.

Delerue F, Sjollem G, Whittle B, Kruger S, Andrews D, Gotz J (2013) Single nucleotide variants (SNVs) define senescence-accelerated SAMP8 mice, a model of a geriatric condition. *J Alzheimers Dis* 36:349-363.

Delgado AC, Ferron SR, Vicente D, Porlan E, Perez-Villalba A, Trujillo CM, D'Ocon P, Farinas I (2014) Endothelial NT-3 delivered by vasculature and CSF promotes quiescence of subependymal neural stem cells through nitric oxide induction. *Neuron* 83:572-585.

Demars M, Hu YS, Gadadhar A, Lazarov O (2010) Impaired neurogenesis is an early event in the etiology of familial Alzheimer's disease in transgenic mice. *J Neurosci Res* 88:2103-2117.

Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, . (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9363-9367.

- Doetsch F**, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997) Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17:5046-5061.
- Doetsch F**, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999) Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11619-11624.
- Donovan MH**, Yazdani U, Norris RD, Games D, German DC, Eisch AJ (2006) Decreased adult hippocampal neurogenesis in the PDAPP mouse model of Alzheimer's disease. *J Comp Neurol* 495:70-83.
- Doty RL** (2008) The olfactory vector hypothesis of neurodegenerative disease: is it viable? *Ann Neurol* 63:7-15.
- Du J**, Zhu Y, Chen X, Fei Z, Yang S, Yuan W, Zhang J, Zhu T (2007) Protective effect of bone morphogenetic protein-6 on neurons from H₂O₂ injury. *Brain Res* 1163:10-20.
- Durany N**, Michel T, Kurt J, Cruz-Sanchez FF, Cervas-Navarro J, Riederer P (2000) Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 levels in Alzheimer's disease brains. *Int J Dev Neurosci* 18:807-813.
- Encinas JM**, Michurina TV, Peunova N, Park JH, Tordo J, Peterson DA, Fishell G, Koulakov A, Enikolopov G (2011) Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 8:566-579.
- Eriksson PS**, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4:1313-1317.
- Ermini FV**, Grathwohl S, Radde R, Yamaguchi M, Staufenbiel M, Palmer TD, Jucker M (2008) Neurogenesis and alterations of neural stem cells in mouse models of cerebral amyloidosis. *Am J Pathol* 172:1520-1528.
- Ernst A**, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Perl S, Tisdale J, Possnert G, Druid H, Frisen J (2014) Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell* 156:1072-1083.
- Fernandez-Gomez FJ**, Munoz-Delgado E, Montenegro MF, Campoy FJ, Vidal CJ, Jordan J (2010) Cholinesterase activity in brain of senescence-accelerated-resistant mouse SAMR1 and its variation in brain of senescence-accelerated-prone mouse SAMP8. *J Neurosci Res* 88:155-166.

Ferron SR, Andreu-Agullo C, Mira H, Sanchez P, Marques-Torrejon MA, Farinas I (2007) A combined ex/in vivo assay to detect effects of exogenously added factors in neural stem cells. *Nat Protoc* 2:849-859.

Frielingsdorf H, Simpson DR, Thal LJ, Pizzo DP (2007) Nerve growth factor promotes survival of new neurons in the adult hippocampus. *Neurobiol Dis* 26:47-55.

Fung J, Frost D, Chakrabartty A, McLaurin J (2004) Interaction of human and mouse Abeta peptides. *J Neurochem* 91:1398-1403.

Gage FH, Coates PW, Palmer TD, Kuhn HG, Fisher LJ, Suhonen JO, Peterson DA, Suhr ST, Ray J (1995) Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11879-11883.

Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, . (1995) Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* 373:523-527.

Gang B, Yue C, Han N, Xue H, Li B, Sun L, Li X, Zhao Q (2011) Limited hippocampal neurogenesis in SAMP8 mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Res* 1389:183-193.

Ge S, Goh EL, Sailor KA, Kitabatake Y, Ming GL, Song H (2006) GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* 439:589-593.

Gheusi G, Cremer H, McLean H, Chazal G, Vincent JD, Lledo PM (2000) Importance of newly generated neurons in the adult olfactory bulb for odor discrimination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1823-1828.

Giulian D (1999) Microglia and the immune pathology of Alzheimer disease. *Am J Hum Genet* 65:13-18.

Glabe C (2001) Intracellular mechanisms of amyloid accumulation and pathogenesis in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* 17:137-145.

Gobeske KT, Das S, Bonaguidi MA, Weiss C, Radulovic J, Disterhoft JF, Kessler JA (2009) BMP signaling mediates effects of exercise on hippocampal neurogenesis and cognition in mice. *PLoS One* 4:e7506.

Goedert M, Spillantini MG (2006) A century of Alzheimer's disease. *Science* 314:777-781.

Gomes WA, Mehler MF, Kessler JA (2003) Transgenic overexpression of BMP4 increases astroglial and decreases oligodendroglial lineage commitment. *Dev Biol* 255:164-177.

Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG (1999) Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science* 286:548-552.

Gratacos E, Gavalda N, Alberch J (2002) Bone morphogenetic protein-6 is a neurotrophic factor for calbindin-positive striatal neurons. *J Neurosci Res* 70:638-644.

Griffin RJ, Moloney A, Kelliher M, Johnston JA, Ravid R, Dockery P, O'Connor R, O'Neill C (2005) Activation of Akt/PKB, increased phosphorylation of Akt substrates and loss and altered distribution of Akt and PTEN are features of Alzheimer's disease pathology. *J Neurochem* 93:105-117.

Griffin WS (2006) Inflammation and neurodegenerative diseases. *Am J Clin Nutr* 83:470S-474S.

Gritti A, Bonfanti L, Doetsch F, Caille I, Alvarez-Buylla A, Lim DA, Galli R, Verdugo JM, Herrera DG, Vescovi AL (2002) Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *J Neurosci* 22:437-445.

Gritti A, Parati EA, Cova L, Frolichsthal P, Galli R, Wanke E, Faravelli L, Morassutti DJ, Roisen F, Nickel DD, Vescovi AL (1996) Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J Neurosci* 16:1091-1100.

Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM (1986) Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 261:6084-6089.

Hack MA, Saghatelian A, de CA, Pfeifer A, Ashery-Padan R, Lledo PM, Gotz M (2005) Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. *Nat Neurosci* 8:865-872.

Hardy J (2002) Testing times for the "amyloid cascade hypothesis". *Neurobiol Aging* 23:1073-1074.

Hassel S, Schmitt S, Hartung A, Roth M, Nohe A, Petersen N, Ehrlich M, Henis YI, Sebald W, Knaus P (2003) Initiation of Smad-dependent and Smad-independent signaling via distinct BMP-receptor complexes. *J Bone Joint Surg Am* 85-A Suppl 3:44-51.

Haughey NJ, Liu D, Nath A, Borchard AC, Mattson MP (2002) Disruption of neurogenesis in the subventricular zone of adult mice, and in human cortical neuronal precursor cells in culture, by amyloid beta-peptide: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med* 1:125-135.

Hensley K, Carney JM, Mattson MP, Aksenova M, Harris M, Wu JF, Floyd RA, Butterfield DA (1994) A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:3270-3274.

Heo C, Chang KA, Choi HS, Kim HS, Kim S, Liew H, Kim JA, Yu E, Ma J, Suh YH (2007) Effects of the monomeric, oligomeric, and fibrillar Abeta42 peptides on the proliferation and differentiation of adult neural stem cells from subventricular zone. *J Neurochem* 102:493-500.

Hock C, Heese K, Hulette C, Rosenberg C, Otten U (2000) Region-specific neurotrophin imbalances in Alzheimer disease: decreased levels of brain-derived neurotrophic factor and increased levels of nerve growth factor in hippocampus and cortical areas. *Arch Neurol* 57:846-851.

Hogan BL (1996) Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev* 6:432-438.

Hoglinger GU, Rizk P, Muriel MP, Duyckaerts C, Oertel WH, Caille I, Hirsch EC (2004) Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat Neurosci* 7:726-735.

Holcomb L, Gordon MN, McGowan E, Yu X, Benkovic S, Jantzen P, Wright K, Saad I, Mueller R, Morgan D, Sanders S, Zehr C, O'Campo K, Hardy J, Prada CM, Eckman C, Younkin S, Hsiao K, Duff K (1998) Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat Med* 4:97-100.

Holick KA, Lee DC, Hen R, Dulawa SC (2008) Behavioral effects of chronic fluoxetine in BALB/cJ mice do not require adult hippocampal neurogenesis or the serotonin 1A receptor. *Neuropsychopharmacology* 33:406-417.

Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G (1996) Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274:99-102.

Hsieh J (2012) Orchestrating transcriptional control of adult neurogenesis. *Genes Dev* 26:1010-1021.

Hynd MR, Scott HL, Dodd PR (2004) Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 45:583-595.

Ihrie RA, Alvarez-Buylla A (2011) Lake-front property: a unique germinal niche by the lateral ventricles of the adult brain. *Neuron* 70:674-686.

Imayoshi I, Sakamoto M, Yamaguchi M, Mori K, Kageyama R (2010) Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains. *J Neurosci* 30:3489-3498.

Inestrosa NC, Toledo EM (2008) The role of Wnt signaling in neuronal dysfunction in Alzheimer's Disease. *Mol Neurodegener* 3:9.

Irvine EE, Drinkwater L, Radwanska K, Al-Qassab H, Smith MA, O'Brien M, Kielar C, Choudhury AI, Krauss S, Cooper JD, Withers DJ, Giese KP (2011) Insulin receptor substrate 2 is a negative regulator of memory formation. *Learn Mem* 18:375-383.

Itoh S, Itoh F, Goumans MJ, Ten DP (2000) Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur J Biochem* 267:6954-6967.

Iwasaki S, Iguchi M, Watanabe K, Hoshino R, Tsujimoto M, Kohno M (1999) Specific activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway and induction of neurite outgrowth in PC12 cells by bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem* 274:26503-26510.

Jacobs BL, van PH, Gage FH (2000) Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. *Mol Psychiatry* 5:262-269.

Jankowsky JL, Slunt HH, Ratovitski T, Jenkins NA, Copeland NG, Borchelt DR (2001) Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: a comparison of strategies. *Biomol Eng* 17:157-165.

Jiang W, Wan Q, Zhang ZJ, Wang WD, Huang YG, Rao ZR, Zhang X (2003) Dentate granule cell neurogenesis after seizures induced by pentylentetrazol in rats. *Brain Res* 977:141-148.

Jimenez S, Torres M, Vizuite M, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mejias E, Trujillo-Estrada L, Carmona-Cuenca I, Caballero C, Ruano D, Gutierrez A, Vitorica J (2011) Age-dependent accumulation of soluble amyloid beta (A β) oligomers reverses the neuroprotective effect of soluble amyloid precursor protein- α (sAPP(α)) by modulating phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt-GSK-3 β pathway in Alzheimer mouse model. *J Biol Chem* 286:18414-18425.

Jin K, Galvan V, Xie L, Mao XO, Gorostiza OF, Bredesen DE, Greenberg DA (2004) Enhanced neurogenesis in Alzheimer's disease transgenic (PDGF-APP^{Sw,Ind}) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:13363-13367.

Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA (2002) Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11946-11950.

Johansson CB, Svensson M, Wallstedt L, Janson AM, Frisen J (1999) Neural stem cells in the adult human brain. *Exp Cell Res* 253:733-736.

Kaplan MS, Hinds JW (1977) Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197:1092-1094.

Kawabata M, Imamura T, Miyazono K (1998) Signal transduction by bone morphogenetic proteins. Cytokine Growth Factor Rev 9:49-61.

Kawaguchi A, Miyata T, Sawamoto K, Takashita N, Murayama A, Akamatsu W, Ogawa M, Okabe M, Tano Y, Goldman SA, Okano H (2001) Nestin-EGFP transgenic mice: visualization of the self-renewal and multipotency of CNS stem cells. Mol Cell Neurosci 17:259-273.

Kawas CH, Corrada MM (2006) Alzheimer's and dementia in the oldest-old: a century of challenges. Curr Alzheimer Res 3:411-419.

Kay JN, Blum M (2000) Differential response of ventral midbrain and striatal progenitor cells to lesions of the nigrostriatal dopaminergic projection. Dev Neurosci 22:56-67.

Kempermann G, Gage FH (2000) Neurogenesis in the adult hippocampus. Novartis Found Symp 231:220-235.

Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G (2004) Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. Trends Neurosci 27:447-452.

Kippin TE, Martens DJ, van der KD (2005) p21 loss compromises the relative quiescence of forebrain stem cell proliferation leading to exhaustion of their proliferation capacity. Genes Dev 19:756-767.

Kirby ED, Muroy SE, Sun WG, Covarrubias D, Leong MJ, Barchas LA, Kaufer D (2013) Acute stress enhances adult rat hippocampal neurogenesis and activation of newborn neurons via secreted astrocytic FGF2. Elife 2:e00362.

Komitova M, Zhu X, Serwanski DR, Nishiyama A (2009) NG2 cells are distinct from neurogenic cells in the postnatal mouse subventricular zone. J Comp Neurol 512:702-716.

Kornack DR, Rakic P (2001) Cell proliferation without neurogenesis in adult primate neocortex. Science 294:2127-2130.

Kozawa O, Hatakeyama D, Uematsu T (2002) Divergent regulation by p44/p42 MAP kinase and p38 MAP kinase of bone morphogenetic protein-4-stimulated osteocalcin synthesis in osteoblasts. J Cell Biochem 84:583-589.

Kriegstein A, Alvarez-Buylla A (2009) The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. Annu Rev Neurosci 32:149-184.

Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16:2027-2033.

Kumar VB, Farr SA, Flood JF, Kamlesh V, Franko M, Banks WA, Morley JE (2000) Site-directed antisense oligonucleotide decreases the expression of amyloid precursor protein and reverses deficits in learning and memory in aged SAMP8 mice. *Peptides* 21:1769-1775.

Kumar VB, Vyas K, Franko M, Choudhary V, Buddhiraju C, Alvarez J, Morley JE (2001) Molecular cloning, expression, and regulation of hippocampal amyloid precursor protein of senescence accelerated mouse (SAMP8). *Biochem Cell Biol* 79:57-67.

LaFerla FM, Oddo S (2005) Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction. *Trends Mol Med* 11:170-176.

Lai K, Kaspar BK, Gage FH, Schaffer DV (2003) Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat Neurosci* 6:21-27.

Laplagne DA, Kamienkowski JE, Esposito MS, Piatti VC, Zhao C, Gage FH, Schinder AF (2007) Similar GABAergic inputs in dentate granule cells born during embryonic and adult neurogenesis. *Eur J Neurosci* 25:2973-2981.

Lazarov O, Marr RA (2010) Neurogenesis and Alzheimer's disease: at the crossroads. *Exp Neurol* 223:267-281.

Le Belle JE, Orozco NM, Paucar AA, Saxe JP, Mottahedeh J, Pyle AD, Wu H, Kornblum HI (2011) Proliferative neural stem cells have high endogenous ROS levels that regulate self-renewal and neurogenesis in a PI3K/Akt-dependant manner. *Cell Stem Cell* 8:59-71.

Li D, Tang J, Xu H, Fan X, Bai Y, Yang L (2008) Decreased hippocampal cell proliferation correlates with increased expression of BMP4 in the APPswe/PS1DeltaE9 mouse model of Alzheimer's disease. *Hippocampus* 18:692-698.

Li G, Cheng H, Zhang X, Shang X, Xie H, Zhang X, Yu J, Han J (2013) Hippocampal neuron loss is correlated with cognitive deficits in SAMP8 mice. *Neurol Sci* 34:963-969.

Lie DC, Colamarino SA, Song HJ, Desire L, Mira H, Consiglio A, Lein ES, Jessberger S, Lansford H, Dearie AR, Gage FH (2005) Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature* 437:1370-1375.

Lim DA, Huang YC, Alvarez-Buylla A (2007) The adult neural stem cell niche: lessons for future neural cell replacement strategies. *Neurosurg Clin N Am* 18:81-92, ix.

Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2000) Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* 28:713-726.

Liu X, Wang Q, Haydar TF, Bordey A (2005) Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nat Neurosci* 8:1179-1187.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.

Lledo PM, Merkle FT, Alvarez-Buylla A (2008) Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity. *Trends Neurosci* 31:392-400.

Lois C, Alvarez-Buylla A (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264:1145-1148.

Lopez-Toledano MA, Ali FM, Patel NS, Wahlestedt C (2010) Adult neurogenesis: a potential tool for early diagnosis in Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis* 20:395-408.

Lopez-Toledano MA, Shelanski ML (2004) Neurogenic effect of beta-amyloid peptide in the development of neural stem cells. *J Neurosci* 24:5439-5444.

Lopez-Toledano MA, Shelanski ML (2007) Increased neurogenesis in young transgenic mice overexpressing human APP(Sw, Ind). *J Alzheimers Dis* 12:229-240.

Manich G, del VJ, Cabezón I, Camins A, Pallas M, Pegleri C, Vilaplana J (2014) Presence of a neo-epitope and absence of amyloid beta and tau protein in degenerative hippocampal granules of aged mice. *Age (Dordr)* 36:151-165.

Martin ED, Sanchez-Perez A, Trejo JL, Martin-Aldana JA, Cano JM, Pons S, Acosta UC, Menes L, White MF, Burks DJ (2012) IRS-2 Deficiency impairs NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *Cereb Cortex* 22:1717-1727.

Mazur-Kolecka B, Golabek A, Nowicki K, Flory M, Frackowiak J (2006) Amyloid-beta impairs development of neuronal progenitor cells by oxidative mechanisms. *Neurobiol Aging* 27:1181-1192.

Mc Donald JM, Savva GM, Brayne C, Welzel AT, Forster G, Shankar GM, Selkoe DJ, Ince PG, Walsh DM (2010) The presence of sodium dodecyl sulphate-stable Abeta dimers is strongly associated with Alzheimer-type dementia. *Brain* 133:1328-1341.

McHugh TJ, Jones MW, Quinn JJ, Balthasar N, Coppari R, Elmquist JK, Lowell BB, Fanselow MS, Wilson MA, Tonegawa S (2007) Dentate gyrus NMDA receptors mediate rapid pattern separation in the hippocampal network. *Science* 317:94-99.

Menn B, Garcia-Verdugo JM, Yaschine C, Gonzalez-Perez O, Rowitch D, Alvarez-Buylla A (2006) Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci* 26:7907-7918.

Messier B, Leblond CP, Smart I (1958) Presence of DNA synthesis and mitosis in the brain of young adult mice. *Exp Cell Res* 14: 224-226.

Millet P, Lages CS, Haik S, Nowak E, Allemand I, Granotier C, Boussin FD (2005) Amyloid-beta peptide triggers Fas-independent apoptosis and differentiation of neural progenitor cells. *Neurobiol Dis* 19:57-65.

Ming GL, Song H (2005) Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 28:223-250.

Mira H, Andreu Z, Suh H, Lie DC, Jessberger S, Consiglio A, San EJ, Hortiguera R, Marques-Torres MA, Nakashima K, Colak D, Gotz M, Farinas I, Gage FH (2010) Signaling through BMPRII regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 7:78-89.

Mirochnic S, Wolf S, Staufenbiel M, Kempermann G (2009) Age effects on the regulation of adult hippocampal neurogenesis by physical activity and environmental enrichment in the APP23 mouse model of Alzheimer disease. *Hippocampus* 19:1008-1018.

Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2008) Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell* 3:265-278.

Mongiat LA, Esposito MS, Lombardi G, Schinder AF (2009) Reliable activation of immature neurons in the adult hippocampus. *PLoS One* 4:e5320.

Moreno-Estelles M, Diaz-Moreno M, Gonzalez-Gomez P, Andreu Z, Mira H (2012) Single and dual birthdating procedures for assessing the response of adult neural stem cells to the infusion of a soluble factor using halogenated thymidine analogs. *Curr Protoc Stem Cell Biol* Chapter 2:Unit.

Mori T, Tanaka K, Buffo A, Wurst W, Kuhn R, Gotz M (2006) Inducible gene deletion in astroglia and radial glia--a valuable tool for functional and lineage analysis. *Glia* 54:21-34.

Morley JE (2002) The SAMP8 mouse: a model of Alzheimer disease? *Biogerontology* 3:57-60.

Morley JE, Farr SA, Kumar VB, Armbrrecht HJ (2012) The SAMP8 mouse: a model to develop therapeutic interventions for Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des* 18:1123-1130.

Morley JE, Kumar VB, Bernardo AE, Farr SA, Uezu K, Tumosa N, Flood JF (2000) Beta-amyloid precursor polypeptide in SAMP8 mice affects learning and memory. *Peptides* 21:1761-1767.

Morris AM, Churchwell JC, Kesner RP, Gilbert PE (2012) Selective lesions of the dentate gyrus produce disruptions in place learning for adjacent spatial locations. *Neurobiol Learn Mem* 97:326-331.

Morris AM, Curtis BJ, Churchwell JC, Maasberg DW, Kesner RP (2013) Temporal associations for spatial events: the role of the dentate gyrus. *Behav Brain Res* 256:250-256.

Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morassutti D, Weiss S, van der Kooy D (1994) Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 13:1071-1082.

Mu Y, Gage FH (2011) Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 6:85.

Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Johnson-Wood K, McConlogue L (2000) High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci* 20:4050-4058.

Murray AM, Weihmueller FB, Marshall JF, Hurtig HI, Gottlieb GL, Joyce JN (1995) Damage to dopamine systems differs between Parkinson's disease and Alzheimer's disease with parkinsonism. *Ann Neurol* 37:300-312.

Nagy Z, Esiri MM, Smith AD (1997) Expression of cell division markers in the hippocampus in Alzheimer's disease and other neurodegenerative conditions. *Acta Neuropathol* 93:294-300.

Ninkovic J, Gotz M (2007) Signaling in adult neurogenesis: from stem cell niche to neuronal networks. *Curr Opin Neurobiol* 17:338-344.

Noble M, Dietrich J (2004) The complex identity of brain tumors: emerging concerns regarding origin, diversity and plasticity. *Trends Neurosci* 27:148-154.

Nomura Y, Yamanaka Y, Kitamura Y, Arima T, Ohnuki T, Oomura Y, Sasaki K, Nagashima K, Ihara Y (1996) Senescence-accelerated mouse. *Neurochemical studies on aging. Ann N Y Acad Sci* 786:410-418.

Noori HR, Fornal CA (2011) The appropriateness of unbiased optical fractionators to assess cell proliferation in the adult hippocampus. *Front Neurosci* 5:140.

O'Neill C, Kiely AP, Coakley MF, Manning S, Long-Smith CM (2012) Insulin and IGF-1 signalling: longevity, protein homeostasis and Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans* 40:721-727.

Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoft J, Van EL, Berry R, Vassar R (2006) Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci* 26:10129-10140.

Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39:409-421.

Ogata T, Wozney JM, Benazra R, Noda M (1993) Bone morphogenetic protein 2 transiently enhances expression of a gene, *Id* (inhibitor of differentiation), encoding a helix-loop-helix molecule in osteoblast-like cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9219-9222.

Ohnawa I, Takamura C, Morimoto T, Ishiguro M, Kohsaka S (1999) Amino-terminal region of secreted form of amyloid precursor protein stimulates proliferation of neural stem cells. *Eur J Neurosci* 11:1907-1913.

Ott A, Stolk RP, van HF, Pols HA, Hofman A, Breteler MM (1999) Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. *Neurology* 53:1937-1942.

Pakkenberg B, Gundersen HJ (1988) Total number of neurons and glial cells in human brain nuclei estimated by the disector and the fractionator. *J Microsc* 150:1-20.

Pallas M, Camins A, Smith MA, Perry G, Lee HG, Casadesus G (2008) From aging to Alzheimer's disease: unveiling "the switch" with the senescence-accelerated mouse model (SAMP8). *J Alzheimers Dis* 15:615-624.

Palmer TD, Ray J, Gage FH (1995) FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain. *Mol Cell Neurosci* 6:474-486.

Palmer TD, Takahashi J, Gage FH (1997) The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci* 8:389-404.

Pastrana E, Cheng LC, Doetsch F (2009) Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:6387-6392.

Paxinos G, Franklin K (2004) The mouse brain in stereotaxic coordinates. Boston: Elsevier Academic press.

Peters E, Palay SL, Webster H (1991) The fine structure of the nervous system: neurons and their supporting cells. New York: Oxford UP.

Pevny LH, Nicolis SK (2010) Sox2 roles in neural stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 42:421-424.

Platt B, Drever B, Koss D, Stoppelkamp S, Jyoti A, Plano A, Utan A, Merrick G, Ryan D, Melis V, Wan H, Mingarelli M, Porcu E, Scrocchi L, Welch A, Riedel G (2011) Abnormal cognition, sleep, EEG and brain metabolism in a novel knock-in Alzheimer mouse, PLB1. *PLoS One* 6:e27068.

Poirier J, Davignon J, Bouthillier D, Kogan S, Bertrand P, Gauthier S (1993) Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* 342:697-699.

Ponti G, Obernier K, Guinto C, Jose L, Bonfanti L, Alvarez-Buylla A (2013) Cell cycle and lineage progression of neural progenitors in the ventricular-subventricular zones of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:E1045-E1054.

Poon HF, Joshi G, Sultana R, Farr SA, Banks WA, Morley JE, Calabrese V, Butterfield DA (2004) Antisense directed at the Abeta region of APP decreases brain oxidative markers in aged senescence accelerated mice. *Brain Res* 1018:86-96.

Porayette P, Gallego MJ, Kaltcheva MM, Bowen RL, Vadakkadath MS, Atwood CS (2009) Differential processing of amyloid-beta precursor protein directs human embryonic stem cell proliferation and differentiation into neuronal precursor cells. *J Biol Chem* 284:23806-23817.

Raber J, Huang Y, Ashford JW (2004) ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology. *Neurobiol Aging* 25:641-650.

Rai KS, Hattiangady B, Shetty AK (2007) Enhanced production and dendritic growth of new dentate granule cells in the middle-aged hippocampus following intracerebroventricular FGF-2 infusions. *Eur J Neurosci* 26:1765-1779.

Religa P, Cao R, Religa D, Xue Y, Bogdanovic N, Westaway D, Marti HH, Winblad B, Cao Y (2013) VEGF significantly restores impaired memory behavior in Alzheimer's mice by improvement of vascular survival. *Sci Rep* 3:2053.

Reynolds BA, Weiss S (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255:1707-1710.

Rissman RA, Mobley WC (2011) Implications for treatment: GABAA receptors in aging, Down syndrome and Alzheimer's disease. *J Neurochem* 117:613-622.

Rockenstein E, Mallory M, Mante M, Sisk A, Masliah E (2001) Early formation of mature amyloid-beta protein deposits in a mutant APP transgenic model depends on levels of Abeta(1-42). *J Neurosci Res* 66:573-582.

Rockenstein EM, McConlogue L, Tan H, Power M, Masliah E, Mucke L (1995) Levels and alternative splicing of amyloid beta protein precursor (APP) transcripts in brains of APP transgenic mice and humans with Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 270:28257-28267.

Rodriguez JJ, Jones VC, Tabuchi M, Allan SM, Knight EM, LaFerla FM, Oddo S, Verkhratsky A (2008) Impaired adult neurogenesis in the dentate gyrus of a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* 3:e2935.

Rodriguez JJ, Verkhratsky A (2011) Neurogenesis in Alzheimer's disease. *J Anat* 219:78-89.

Sakamoto M, Kageyama R, Imayoshi I (2014) The functional significance of newly born neurons integrated into olfactory bulb circuits. *Front Neurosci* 8:121.

Scharfman H, Goodman J, Macleod A, Phani S, Antonelli C, Croll S (2005) Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats. *Exp Neurol* 192:348-356.

Schneider I, Reverse D, Dewachter I, Ris L, Caluwaerts N, Kuiperi C, Gilis M, Geerts H, Kretschmar H, Godaux E, Moechars D, Van LF, Herms J (2001) Mutant presenilins disturb neuronal calcium homeostasis in the brain of transgenic mice, decreasing the threshold for excitotoxicity and facilitating long-term potentiation. *J Biol Chem* 276:11539-11544.

Scholzen T, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182:311-322.

Scott SA, Mufson EJ, Weingartner JA, Skau KA, Crutcher KA (1995) Nerve growth factor in Alzheimer's disease: increased levels throughout the brain coupled with declines in nucleus basalis. *J Neurosci* 15:6213-6221.

Selkoe DJ (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81:741-766.

Seri B, Herrera DG, Gritti A, Ferron S, Collado L, Vescovi A, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2006) Composition and organization of the SCZ: a large germinal layer containing neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cereb Cortex* 16 Suppl 1:i103-i111.

Shetty AK, Hattiangady B, Shetty GA (2005) Stem/progenitor cell proliferation factors FGF-2, IGF-1, and VEGF exhibit early decline during the course of aging in the hippocampus: role of astrocytes. *Glia* 51:173-186.

Shihabuddin LS, Horner PJ, Ray J, Gage FH (2000) Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus. *J Neurosci* 20:8727-8735.

Shimazu K, Zhao M, Sakata K, Akbarian S, Bates B, Jaenisch R, Lu B (2006) NT-3 facilitates hippocampal plasticity and learning and memory by regulating neurogenesis. *Learn Mem* 13:307-315.

Shingo T, Gregg C, Enwere E, Fujikawa H, Hassam R, Geary C, Cross JC, Weiss S (2003) Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science* 299:117-120.

Snyder JS, Hong NS, McDonald RJ, Wojtowicz JM (2005) A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience* 130:843-852.

Song H, Stevens CF, Gage FH (2002) Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417:39-44.

Sotthibundhu A, Li QX, Thangnipon W, Coulson EJ (2009) Abeta(1-42) stimulates adult SVZ neurogenesis through the p75 neurotrophin receptor. *Neurobiol Aging* 30:1975-1985.

Steiner B, Kronenberg G, Jessberger S, Brandt MD, Reuter K, Kempermann G (2004) Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Glia* 46:41-52.

Stine WB, Jungbauer L, Yu C, LaDu MJ (2011) Preparing synthetic Abeta in different aggregation states. *Methods Mol Biol* 670:13-32.

Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Burki K, Frey P, Paganetti PA, Waridel C, Calhoun ME, Jucker M, Probst A, Staufenbiel M, Sommer B (1997) Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13287-13292.

Suh H, Consiglio A, Ray J, Sawai T, D'Amour KA, Gage FH (2007) In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 1:515-528.

Sun L, Guo C, Wang T, Li X, Li G, Luo Y, Xiao S (2014) LIMK1 is involved in the protective effects of bone morphogenetic protein 6 against amyloid-beta-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons. *J Alzheimers Dis* 42:543-554.

Sureda FX, Gutierrez-Cuesta J, Romeu M, Mulero M, Canudas AM, Camins A, Mallol J, Pallas M (2006) Changes in oxidative stress parameters and neurodegeneration markers in the brain of the senescence-accelerated mice SAMP-8. *Exp Gerontol* 41:360-367.

Takagane K, Nojima J, Mitsunashi H, Suo S, Yanagihara D, Takaiwa F, Urano Y, Noguchi N, Ishiura S (2015) Abeta induces oxidative stress in senescence-accelerated (SAMP8) mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 1-7.

Takeda T, Hosokawa M, Takeshita S, Irino M, Higuchi K, Matsushita T, Tomita Y, Yasuhira K, Hamamoto H, Shimizu K, Ishii M, Yamamuro T (1981) A new murine model of accelerated senescence. *Mech Ageing Dev* 17:183-194.

Takeda T, Matsushita T, Kurozumi M, Takemura K, Higuchi K, Hosokawa M (1997) Pathobiology of the senescence-accelerated mouse (SAM). *Exp Gerontol* 32:117-127.

Tanaka J, Okuma Y, Tomobe K, Nomura Y (2005) The age-related degeneration of oligodendrocytes in the hippocampus of the senescence-accelerated mouse (SAM) P8: a quantitative immunohistochemical study. *Biol Pharm Bull* 28:615-618.

Tang J, Song M, Wang Y, Fan X, Xu H, Bai Y (2009) Noggin and BMP4 co-modulate adult hippocampal neurogenesis in the APP(swe)/PS1(DeltaE9) transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 385:341-345.

Traiffort E, Angot E, Ruat M (2010) Sonic Hedgehog signaling in the mammalian brain. *J Neurochem* 113:576-590.

Tsuchida K, Nakatani M, Hitachi K, Uezumi A, Sunada Y, Ageta H, Inokuchi K (2009) Activin signaling as an emerging target for therapeutic interventions. *Cell Commun Signal* 7:15.

Ueki T, Tanaka M, Yamashita K, Mikawa S, Qiu Z, Maragakis NJ, Hevner RF, Miura N, Sugimura H, Sato K (2003) A novel secretory factor, Neurogenesisin-1, provides neurogenic environmental cues for neural stem cells in the adult hippocampus. *J Neurosci* 23:11732-11740.

Urist MR (1965) Bone: formation by autoinduction. *Science* 150:893-899.

Van Praag H, Kempermann G, Gage FH (1999) Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 2:266-270.

Van Praag H, Kempermann G, Gage FH (2000) Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci* 1:191-198.

Van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415:1030-1034.

Varela-Nallar L, Aranguiz FC, Abbott AC, Slater PG, Inestrosa NC (2010) Adult hippocampal neurogenesis in aging and Alzheimer's disease. *Birth Defects Res C Embryo Today* 90:284-296.

Wang R, Dineley KT, Sweatt JD, Zheng H (2004) Presenilin 1 familial Alzheimer's disease mutation leads to defective associative learning and impaired adult neurogenesis. *Neuroscience* 126:305-312.

Wang Y, Chang CF, Morales M, Chou J, Chen HL, Chiang YH, Lin SZ, Cadet JL, Deng X, Wang JY, Chen SY, Kaplan PL, Hoffer BJ (2001) Bone morphogenetic protein-6 reduces ischemia-induced brain damage in rats. *Stroke* 32:2170-2178.

Wen PH, Hof PR, Chen X, Gluck K, Austin G, YOUNKIN SG, YOUNKIN LH, DeGasperi R, Gama Sosa MA, Robakis NK, Haroutunian V, Elder GA (2004) The presenilin-1 familial Alzheimer disease mutant P117L impairs neurogenesis in the hippocampus of adult mice. *Exp Neurol* 188:224-237.

Winner B, Kohl Z, Gage FH (2011) Neurodegenerative disease and adult neurogenesis. *Eur J Neurosci* 33:1139-1151.

Wu Y, Zhang AQ, Yew DT (2005) Age related changes of various markers of astrocytes in senescence-accelerated mice hippocampus. *Neurochem Int* 46:565-574.

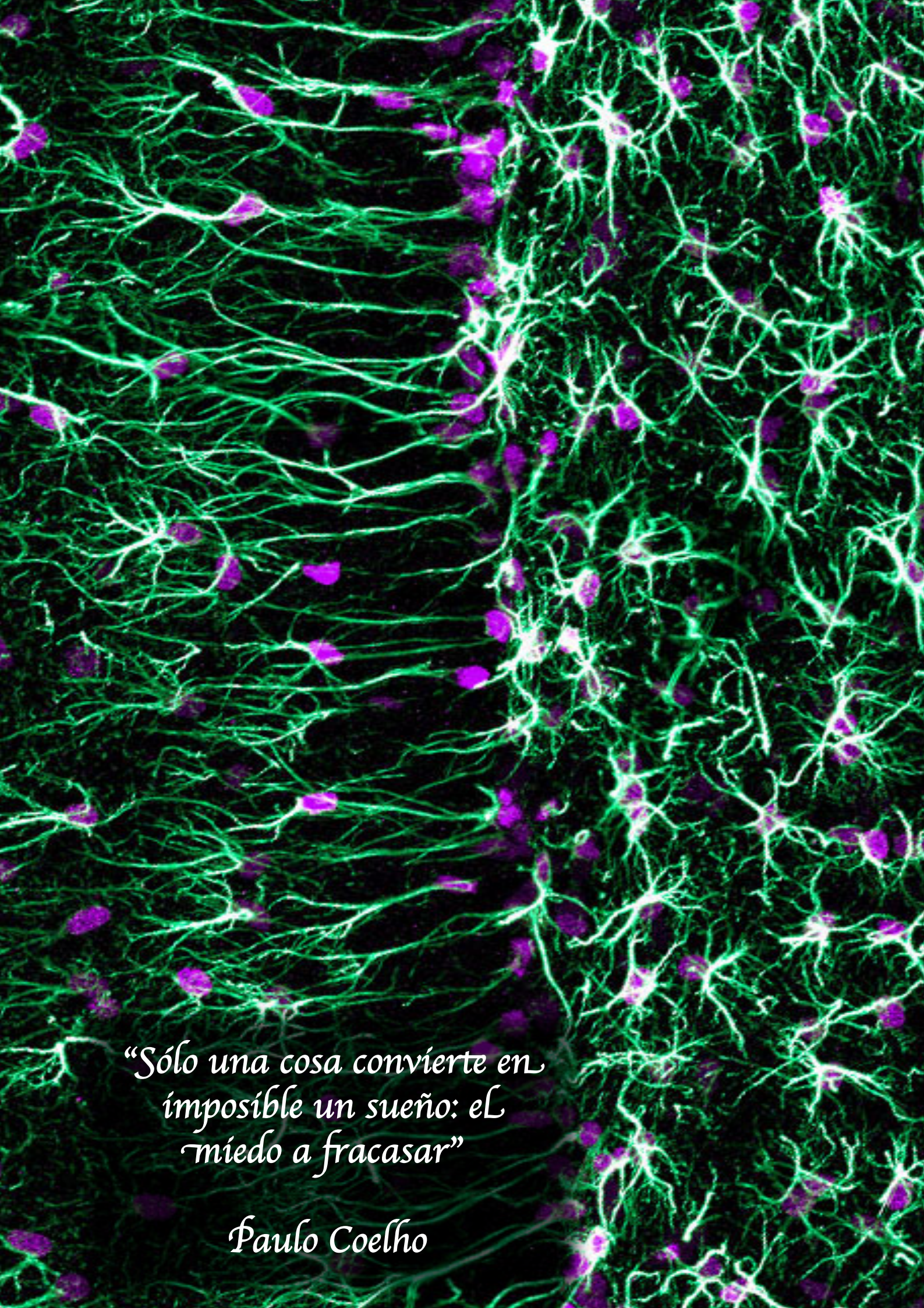
Yasui F, Ishibashi M, Matsugo S, Kojo S, Oomura Y, Sasaki K (2003) Brain lipid hydroperoxide level increases in senescence-accelerated mice at an early age. *Neurosci Lett* 350:66-68.

Yousef H, Morgenthaler A, Schlesinger C, Bugaj L, Conboy IM, Schaffer DV (2014) Age-Associated Increase in BMP Signaling inhibits Hippocampal Neurogenesis. *Stem Cells*.

Zhang C, McNeil E, Dressler L, Siman R (2007) Long-lasting impairment in hippocampal neurogenesis associated with amyloid deposition in a knock-in mouse model of familial Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 204:77-87.

Zhao C, Deng W, Gage FH (2008) Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132:645-660.

Zhao M, Momba S, Delfani K, Carlen M, Cassidy RM, Johansson CB, Brismar H, Shupliakov O, Frisen J, Janson AM (2003) Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7925-7930.



*“Sólo una cosa convierte en
imposible un sueño: el
miedo a fracasar”*

Paulo Coelho

anexo

ANEXO

Publicaciones que forman parte de la tesis

AUTORES (p.o. de firma): Díaz-Moreno M, Hortigüela R, Gonçalves A, García-Carpio I, Manich G, García-Bermúdez E, Moreno-Estellés M, Eguiluz C, Vilaplana J, Pelegrí C, Vilar M y Mira H.

TÍTULO: Aβ increases neural stem cell activity in senescence-accelerated SAMP8 mice

REFERENCIA: Neurobiol Aging. 2013 Nov;34(11):2623-2638. doi: 10.1016

Otras publicaciones

AUTORES (p.o. de firma): Castro-Garcia P, Díaz-Moreno M, Gil-Gas C, Fernández-Gómez FJ, Honrubia-Gómez P, Álvarez-Simón CB, Sánchez-Sánchez, Castillo Cano JC, Almeida Rodríguez F, Blanco V, Jordán J, Mira H y Ramírez-Castillejo C.

TÍTULO: Defects in subventricular zone pigmented epithelium-derived factor niche signaling in the senescence-accelerated mouse prone-8

REFERENCIA: The FASEB journal. 2015 Jan 30. [Epub ahead of print]

AUTORES (p.o. de firma): Moreno-Estelles M, Gonzalez-Gomez P, Hortigüela R, Díaz-Moreno M, San Emeterio J, Carvalho AL, Farinas I, Mira H.

TÍTULO: Symmetric expansion of neural stem cells from the adult olfactory bulb is driven by astrocytes via WNT7A

REFERENCIA: Stem Cells. 2012 Dec;30(12):2796-2809. doi: 10.1002/stem.1243

AUTORES (p.o. de firma): Moreno-Estelles M, Díaz-Moreno M, Gonzalez-Gomez P, Andreu Z, Mira H.

TÍTULO: Single and dual birthdating procedures for assessing the response of adult Neural Stem Cells to the infusion of a soluble factor using halogenated thymidine analogues

REFERENCIA: Curr Protoc Stem Cell Biol. 2012 May;Chapter 2:Unit 2D.10. doi: 10.1002/9780470151808.sc02d10s21

